UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

LEILA APARECIDA FIGUEIREDO

Fluoroquinolonas na avicultura: impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos

Piracicaba
2015

LEILA APARECIDA FIGUEIREDO

Fluoroquinolonas na avicultura:

impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos

Versão revisada de acordo com a Resolução COPGr 6018 de 2011

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Figueiredo, Leila Aparecida

Fluoroquinolonas na avicultura: impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos / Leila Aparecida Figueiredo; orientador Valdermar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a Resolução COPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

128 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Antibióticos 2. Cromatografia 3. Microbiologia 4. Pecuária I. Título

CDU 631.461 : 574.64

Aos meus pais, Ademir e Neide

Ao meu irmão, Júnior

Em especial ao meu querido esposo Denis,

que com amor, carinho, paciência

sempre me ajudou na realização deste trabalho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus por me dar forças durante a minha trajetória, desde o curso de Ciências Biológicas na ESALQ/USP, no mestrado e agora durante o doutorado no CENA/USP.

Ao Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pela amizade, orientação, auxílio, compreensão e ensinamentos.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo financiamento durante o desenvolvimento do projeto.

À Comissão de Pós-Graduação (CPG – CENA/USP) pelo apoio, orientação e oportunidade para a realização deste trabalho.

Ao departamento de Ciência do Solo, em especial ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote e seus alunos Pedro e Thiago, pela ajuda com as análises de microbiologia.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) pela oportunidade e estrutura disponível para que este trabalho fosse realizado.

Aos produtores rurais que permitiram que as coletas fossem realizadas em suas propriedades durante todo o estudo.

Ao pessoal do Escritório de Desenvolvimento Rural de Piracicaba (SAA/CATI) que contribuiu com as pesquisas de campo, em especial às Casas de Agricultura de Piracicaba (Basso), Saltinho (Chiquinho) e Tietê (Antonio Carlos).

Aos técnicos do Laboratório de Ecotoxicologia, Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo F. Pimpinato, pela contribuição nos trabalhos, pelas conversas e compreensão e à secretária Renata Pousa Maziero pela eficiência, simpatia e amizade.

Aos amigos de laboratório Marcela, Carol, Kássio, Rafael, Nádia, Bruno, Neide, Franz, Alyne, Carol Poppi, Jéssica e Paulo pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, conselhos e pelas horas de descontração: minha eterna e sincera amizade.

Aos funcionários do CENA/USP que sempre foram muito prestativos e a todos que propiciaram diariamente agradável convivência.

Aos amigos que aqui fiz e que levarei por toda a minha vida: Graziela, Jeane e Sergio. Obrigada pelos conselhos, pela amizade, pela ajuda na execução do trabalho... por estarem sempre presentes!

A toda minha família pelo carinho e apoio recebido.

Meu sincero agradecimento!

RESUMO

FIGUEIREDO, L.A. **Fluoroquinolonas na avicultura: impacto sobre a comunidade bacteriana em solos e organismos aquáticos.** 2015. 128 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

A produção de frango de corte é acompanhada por uma geração elevada de resíduos. Assim, o reuso da cama de aviário como adubo tem se mostrado como uma alternativa viável para a destinação adequada deste resíduo. Entretanto o emprego de fármacos utilizados na produção de aves de corte pode atingir o ambiente e gerar efeitos indesejados tanto na microbiota do solo quanto nos organismos aquáticos de ambientes lacustres próximos aos galpões de produção. O objetivo deste trabalho foi quantificar os fármacos norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e ciprofloxacina (CIP) nas matrizes cama de aviário, solos, águas superficiais, subsuperficiais e sedimentos e avaliar o impacto desta contaminação na microbiota do solo e organismos aquáticos. As coletas foram realizadas em seis granjas de produção de frango de corte em municípios na região de Piracicaba/SP. As extrações e posterior determinação dos antimicrobianos nas amostras de cama de aviário e solo foram realizadas pela técnica de cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos/ultravioleta (HPLC-DAD/UV) e em água superficial, subsuperficial e sedimento foram realizadas por extração em fase sólida acoplada à cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (*on-line*-SPE-LC-MS/MS). A atividade microbiana dos solos foi determinada pelo método da radiorespirometria utilizando ^{14}C-glicose. A estrutura e abundância da comunidade bacteriana foram determinadas pelas técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE) e da PCR em tempo real (*q*PCR). Os testes de toxicidade aguda foram realizados com os organismos aquáticos *Daphnia magna* e *Danio rerio*. Foram encontradas concentrações entre 1,20 e 8,31 mg kg^{-1} de fluoroquinolonas (FQs) em cama de aviário, havendo o acúmulo desses fármacos com seu tempo de uso (até 135 dias). As concentrações de FQs nos solos (10,2 a 325 µg kg^{-1}) foram acima dos níveis tolerados (100 µg kg^{-1}). Não houve efeitos diretos na atividade microbiana, entretanto houve redução na abundância e modificação na estrutura da comunidade bacteriana em determinadas granjas. Nas amostras de água os resultados foram inferiores ao limite de quantificação (20 ng L^{-1}). Em sedimentos foram encontrados valores entre 22,63 e 76,54 ng kg^{-1} de FQs. Os resultados de toxicidade aguda para *D. magna* (CE_{50}-48 h) foram: 92,49 mg L^{-1} e 73,04 mg L^{-1} para ENR e NOR, respectivamente, e para *Danio rerio* a CL_{50} (96 h) foi 190,9 mg L^{-1} para ENR. Observou-se lixiviação de FQs em solos até 4 m de profundidade. Conclui-se que houve contaminação do solo afetando a comunidade bacteriana. Não houve contaminação de águas superficiais e subsuperficiais, sendo que ENR e NOR somente causam toxicidade aguda em organismos aquáticos em concentrações muito acima das encontradas em campo. Esses resultados sugerem medidas mitigadoras de contaminação, como a exposição prévia da cama de aviário à luz solar e a modernização dos sistemas de bebedouro dos galpões, uma vez que a água descartada foi um importante veículo das FQs para a cama de aviário e entorno da granja.

Palavras-chave: Contaminação ambiental. Antimicrobianos. Cromatografia. Biologia molecular. Toxicidade aguda.

ABSTRACT

FIGUEIREDO, L.A. **Fluoroquinolones in poultry: impact on the bacterial community in soil and aquatic organisms**. 2015. 128 p. Tese (Doutorado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

The broiler production generates a lot of waste. So the reuse of poultry litter as a fertilizer has proven to be a viable alternative for the appropriate destination of these residues. However the employment of medicines used in the broilers production can reach the environment and cause negative effects in soil microbiota and on aquatic organisms from water bodies close to the production sheds. The objective of this study was to quantify norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in poultry litter, soil, surface and subsurface water, sediment and evaluate the impact of these contamination on soil microbiota and aquatic organisms. Samples were collected in six farms in Piracicaba/SP region. Analyses of antibiotics in soil samples and poultry litter were performed by high performance liquid chromatography-diode array/ultraviolet detector (HPLC-DAD/UV) and in surface, subsurface water and sediment were performed by an online solid phase extraction-liquid chromatography tandem mass spectrometry method (on-line SPE-LC-MS/MS). The microbial soils activities were determined by radiorespirometry using ^{14}C-glucose. The diversity and abundance of bacterial communities were determined by Polymerase Chain Reaction/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR/DGGE) and real-time PCR (qPCR). Acute toxicity tests were performed to aquatic organisms *Daphnia magna* and *Danio rerio*. It was found concentrations between 1.20 and 8.31 mg kg^{-1} of fluoroquinolones (FQs) in poultry litter and these antibiotics accumulated in time (up to 135 days). In soils, concentrations of FQs were between 10.2 and 325 µg kg^{-1}, these values were higher than the allowable levels (100 µg kg^{-1}). There were no direct effects on soil microbial activity, however there were reduction in abundance and diversity of bacterial community in some farms. In water samples the results were lower than the limit of quantification (20 ng L^{-1}). In sediment, values of FQs were between 22.63 and 76.54 ng kg^{-1}. Acute toxicity for *D. magna* (CE_{50}-48 h) were 92.49 mg L^{-1} and 73.04 mg L^{-1} for ENR and NOR, respectively, and for *Danio rerio* LC_{50} (96h) was 190.9 mg L^{-1} for ENR. It was observed FQs leaching in soil up to 4 m depth. It was concluded that soil contamination impacts bacterial community. There was no contamination in superficias and subsurface waters. ENR and NOR only cause acute toxicity to aquatic organisms in higher concentrations than those found in the environment. These results suggest mitigation measures for contamination, as previous exposure of poultry litter to sunlight and the modernization of water systems, once the wastewater was an important vehicle for FQs to poultry litter and environment.

Keywords: Environmental contamination. Antibiotics. Chromatography. Molecular Biology. Acute toxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL 15
2. REVISÃO DE LITERATURA 17
2.1 Produção de frango de corte no Brasil 17
2.2 Uso de fármacos na avicultura 17
2.3 Propriedades das fluoroquinolonas (FQs) 18
2.4 Aplicação de cama de aviário na produção agrícola 19
2.5 Contaminação em matrizes ambientais 22
2.6 Microbiota do solo 23
2.7 Toxicidade aguda em organismos aquáticos 24
Referências 26
3. Determinação de fluoroquinolonas em cama de aviário e solos e alteração na estrutura da comunidade microbiana 33
3.1 Introdução 35
3.2 Material e Métodos 36
3.2.1 Seleção das granjas e questionário para os produtores 36
3.2.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em cama de aviário 38
3.2.2.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em solo 39
3.2.2.2 Desenvolvimento da metodologia analítica para análise de NOR, ENR e CIP em cama de aviário e solo 39
3.2.2.3 Validação da metodologia analítica para análise de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em cama de aviário e solo por HPLC-DAD/UV 41
3.2.2.4 Análise estatística 44
3.2.3 Avaliação da atividade microbiana em amostras de solo através da técnica de radiorespirometria 44
3.2.3.1 Determinação da umidade nas amostras de solo (U) 45
3.2.3.2 Determinação da capacidade de campo (CC) 45
3.2.3.3 Determinação da quantidade de solo a ser pesado 46
3.2.3.4 Determinação do volume de água a ser adicionado nos frascos 46
3.2.3.5 Montagem dos experimentos 47
3.2.3.6 Análise estatística 48
3.2.4 Quantificação e caracterização da comunidade bacteriana do solo pelas técnicas de *q*PCR e PCR/DGGE 49
3.2.4.1 Coleta de solo 49
3.2.4.2 Análise estatística 51
3.3 Resultados e Discussão 52

3.3.1 Determinação de FQs em cama de aviário 52
3.3.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em solos de granjas de produção de frango de corte..... 55
3.3.3 Atividade microbiana: Radiorespiometria 61
3.3.4 Abundância bacteriana: PCR quantitativo 65
3.3.5 Estrutura da comunidade bacteriana em solos: PCR/DGGE 69
3.4 Conclusões 72
Referências 73
4. Estudo de ambiente aquático contaminado por fluoroquinolonas 81
4.1 Introdução 83
4.2 Material e Métodos 84
4.2.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em águas superficiais, subsuperficial e sedimento 84
4.2.2 Desenvolvimento da metodologia analítica para análise de NOR, ENR e CIP em água e sedimento por SPE-LC-MS/MS 85
4.2.3 Validação da metodologia analítica para análise de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em água e sedimento por SPE-LC-MS/MS 88
4.2.4 Análise estatística 92
4.3 Resultados e Discussão 92
4.3.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em águas superficiais e subsuperficial 92
4.3.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em sedimento 95
4.4. Conclusões 97
Referências 98
5. Estudos de toxicidade aguda de fluoroquinolonas em organismos aquáticos 103
5.1 Introdução 105
5.2 Material e métodos 106
5.2.1 Manutenção e delineamento experimental com *Daphnia magna* 106
5.2.2 Manutenção e delineamento experimental com *Danio rerio* 106
5.2.3 Análise estatística 107
5.3 Resultados e discussão 107
5.3.1 Testes de toxicidade aguda em *Daphnia magna* 107
5.3.2 Testes de toxicidade aguda em *Danio rerio* 109
5.4. Conclusões 111
Referências 112
6. Lixiviação de fluoroquinolonas em solos de granjas produtoras de frango de corte 115
6.1 Introdução 117
6.2 Material e métodos 118
6.2.1 Extratores de solução com cápsula porosa 118
6.2.2 Poço piezométrico 119

6.2.3 Análise estatística 119
6.3 Resultados e discussão 119
6.4. Conclusões..... 125
Referências 126

1. INTRODUÇÃO GERAL

Toda reutilização de resíduos na agropecuária deve-se atentar pela presença de substâncias potencialmente tóxicas ao meio ambiente. As fluoroquinolonas (FQs), norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e seu metabólito ciprofloxacina (CIP) são fármacos amplamente detectados durante o processo produtivo de frangos de corte, possuem um amplo espectro de ação antimicrobiana e apresentam significativa estabilidade no meio ambiente. Durante o ciclo de vida dos frangos, é comum a eliminação de parte destes compostos pela excreção. A cama de aviário é o principal resíduo gerado da criação de frango de corte, sendo formado por um substrato absorvente (ex. maravalha, casca de arroz, sabugo de milho, bagaço de cana) e as excretas dos frangos (granjadas).

Conforme critério do produtor rural, após 1 a 6 granjadas, a cama de aviário pode ser reutilizada como fertilizante orgânico, com ampla aceitação dos agricultores devido ao incremento de produtividade de sua lavoura. No entanto, os produtores pouco ou nada se preocupam com a presença de substâncias contaminantes neste resíduo, sobretudo os fármacos utilizados no processo de criação das aves. Acredita-se que tais compostos apresentam potencial de contaminação de matrizes ambientais, justificando a necessidade de estudos quanto aos seus efeitos nos organismos expostos.

Visando conhecer a real situação da contaminação das granjas de frango de corte da região de Piracicaba/SP foram realizados estudos de quantificação de NOR, ENR e CIP em cama de aviário, solos, águas superficiais, sedimentos e águas subsuperficiais. Posteriormente foram realizados estudos para verificar se a contaminação de solos gerou efeitos adversos sobre a comunidade microbiana e estrutura da comunidade bacteriana nos mesmos. Também foram realizados testes de toxicidade aguda desses fármacos sobre organismos aquáticos e estudos de lixiviação dessas moléculas em campo.

A técnica abordada nos estudos de determinação e quantificação de NOR, ENR e CIP em cama de aviário e solos foi a cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos/ultravioleta (HPLC-DAD/UV). Já para determinação desses fármacos em águas superficiais, subsuperficial e sedimento, devido a necessidade de maior sensibilidade de detecção dos compostos, empregou-se um método de extração em fase sólida acoplado à cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (*on-line*-SPE-LC-MS/MS). Estudos sobre a comunidade microbiana, abundância e estrutura da comunidade bacteriana foram realizados pelas técnicas de radiorepirometria com uso de ^{14}C-glicose; Reação em Cadeia da Polimerase (*q*PCR), também conhecida por PCR quantitativa e a técnica da Reação

em Cadeia da Polimerase - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE), respectivamente.

Os ensaios sobre toxicidade aguda em ambiente aquático contaminado por NOR, ENR e CIP foram realizados usando os organismos testes *Daphnia magna* (microcrustáceo) e *Danio rerio* (peixe paulistinha). Por fim, os estudos de lixiviação desses fármacos foram realizados em campo com análises de solução do solo percolada e solos coletados durante a instalação de extratores de solução de cápusla porosa (20, 40 e 60 cm de profundidade) e de um poço piezométrico (4 m de profundidade).

Observou-se que houve contaminação por FQs em solos e corpos hídricos e alteração na estrutura da comunidade bacteriana em solos. Este trabalho discutiu e propôs medidas simples que podem prevenir a contaminação ambiental por estes fármacos de uso veterinário.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção de frango de corte no Brasil

O Brasil é um dos principais líderes mundiais na produção de alimentos de origem animal, sendo considerado o maior exportador de carne bovina e de frango e o quarto maior exportador de carne suína (BRASIL, 2015).

O mercado de frango de corte se consolidou no Brasil, principalmente na região Sul, maior produtora do país (EMBRAPA, 2015). No ano de 2014 foram abatidos mais de 5,5 bilhões de animais (IBGE, 2015). Essa taxa de produção elevada deve-se à mudança de hábito de consumo de carne dos brasileiros e o volume de exportações. O Brasil passou de um país preponderantemente consumidor de carne bovina para consumidor de carne de frango, melhorando assim a qualidade do produto a preços mais acessíveis (EMBRAPA, 2015). Os maiores consumidores de carne de frango brasileira no ano de 2014 foram a Arábia Saudita (17,6%), Japão (11,5%), Hong-Kong (8,4%), Emirados Árabes (7,0%), China (6,4%) e Venezuela (4,5%), movimentando um valor de US$ 8,08 bilhões (IBGE, 2015).

Toda essa produção causa impactos ao ambiente, principalmente devido às altas concentrações de fármacos veterinários aplicados durante a produção de frango de corte (MARTINEZ-CARBALLO et al., 2007; MORARU et al., 2012; LI et al., 2013).

2.2 Uso de fármacos na avicultura

Fármacos veterinários têm sido utilizados em grande quantidade na avicultura. Muitas dessas moléculas não são totalmente metabolizadas no organismo animal e seus resíduos têm sido detectados em amostras de solo, sedimento, água superficial e subterrânea (GOLET et al., 2002; MONFORT, 2005; FICK et al., 2009; TEIJON et al., 2010; GOTTSCHALL et al., 2012; LI, et al., 2013; VAN DOORSLAER et al., 2014; HE, BLANEY, 2015). A presença desses medicamentos no ambiente pode favorecer o surgimento de microrganismos ou genes resistentes. Como esses produtos têm sido aplicados na natureza há décadas é importante estudar o comportamento e impacto ambiental decorrente de sua aplicação e de seus metabólitos.

Dentre os fármacos utilizados como medicamento veterinário, merece destaque os antimicrobianos, em especial a classe das fluoroquinolonas (FQs) que inclui a enrofloxacina (ENR), norfloxacina (NOR) e ciprofloxacina (CIP).

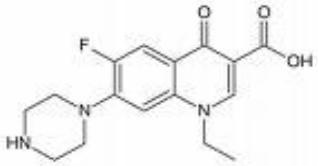
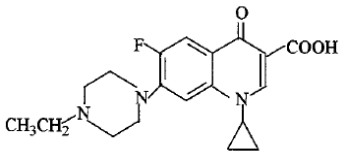
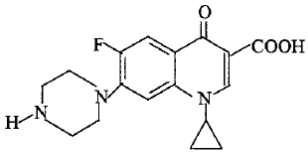
2.3 Propriedades das fluoroquinolonas (FQs)

As FQs pertencem a um grupo de antimicrobianos amplamente prescritos na medicina humana e veterinária (MONFORT, 2005), para tratamento ou prevenção de doenças. Elas apresentam características de amplo espectro de atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e atuam inibindo a atividade das enzimas DNA girase e topoisomerase IV, impedindo a síntese de DNA e a divisão celular, levando à rápida morte celular em organismos sensíveis (HOOPER, 1999; CAO et al., 2015). Esses fármacos são eficazes no tratamento de infecções urinárias, respiratórias e diarréia bacteriana (BARRON et al., 2002; BAKKEN, 2004).

O maior problema do uso desses fármacos está relacionado a contaminação cruzada e o aparecimento de cepas resistentes nos seres humanos (HARTMANN et al., 1998; BENGTSSON-PALME et al., 2014), uma vez que algumas moléculas encontradas no ambiente agrícola (por exemplo: ciprofloxacina) são ministradas também em seres humanos. A principal via de eliminação desses fármacos é pela urina, onde aproximadamente 70% das moléculas excretadas permanecem na sua forma inalterada e cerca de 30% na forma de metabólitos (HALLING-SORENSEN et al., 1998; LINDBERG et al., 2005; SARMAH et al., 2006; KEMPER, 2008; ZUCCATO et al., 2010). Como são moléculas persistentes no ambiente, podem causar contaminação em várias matrizes ambientais (SPELTINI et al., 2011). Essa contaminação pode ser oriunda da excreção de animais tratados com FQs no ambiente; aplicação de esterco contendo FQs na forma de adubo orgânico; irrigação com efluentes contaminados ou com água de rio poluído ou aplicação de lodo de esgoto contaminado como fertilizante (VAN DOORSLAER et al., 2014)

A fluoroquinolona mais utilizada na produção de frango de corte é a ENR (MORALES-GUTIÉRREZ et al., 2015) e seu principal metabólito é a CIP, sendo comum, portanto, a ocorrência de ambas as moléculas no ambiente. Outra molécula bastante utilizada na produção pecuária do Brasil é a NOR (Tabela 2.1).

Tabela 2.1 - Antimicrobianos, massa molar, fórmula molecular, pKa e fórmula estrutural.

Antimicrobiano Massa Molar (MM)	Fórmula molecular	pKa	Fórmula estrutural
NORFLOXACINA MM = 320 g mol^{-1}	$C_{16}H_{18}FN_3O_3$	pKa_1 6,3 pKa_2 8,4	
ENROFLOXACINA MM= 359,4 g mol^{-1}	$C_{19}H_{22}FN_3O_3$	pKa_1 6,4 pKa_2 7,7	
CIPROFLOXACINA MM = 331,3 g mol^{-1}	$C_{17}H_{18}FN_30_3$	pKa_1 6,4 pKa_2 8,6	

2.4 Aplicação de cama de aviário na produção agrícola

A utilização de dejetos de animais para fins de adubação consiste numa das principais vias de disseminação de fármacos veterinários no ambiente. Uma vez no ambiente, os resíduos de antimicrobianos podem acumular-se no solo, sofrer lixiviação ou serem transportados para corpos hídricos via escoamento superficial (DÍAZ-CRUZ et al., 2003).

A cama de aviário é um subproduto da criação de frango de corte no Brasil e seu uso como adubo orgânico é bastante difundido. Atualmente esse substrato tem sido vendido pelos produtores para incrementar a renda familiar e esse resíduo é aplicado em campo devido a presença de macronutrientes (LI et al., 2013). No entanto, a cama de aviário contém quantidades elevadas de FQs devido à excreção de frangos tratados com esses compostos (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; MORARU et al., 2012; XIE et al., 2012) e quando ela é aplicada em campo favorece a contaminação dos solos (GOLET et al., 2002; GOTTSCHALL et al., 2012; LI, et al., 20013; POURCHER et al., 2014;VAN DOORSLAER et al., 2014).

Na região de Piracicaba/SP, uma das maiores produtoras de frango de corte do Estado de São Paulo (Figura 2.1), são utilizadas cerca de 10 toneladas de palhada (cama de aviário) por barracão de produção contendo 15.000 cabeças de frango e essa palhada é reutilizada por

até seis granjadas. Um granjada é um ciclo de produção, desde o momento que os frangos chegam ao barracão até completarem o desenvolvimento e irem para o abate, esse ciclo dura em média 45 dias. Assim, a cama de aviário permanece no barracão por aproximadamente 9 meses e durante este tempo vai acumulando FQs oriundas da medicação dos animais (meia-vida em solos: entre 48 e 1000 dias, dependendo das caracterísitcas do ambiente) (BOXALL et al., 2003; MARTINEZ-CARBALLO et al., 2007; KARCI, BALCIOGLU, 2009; VAN DOORSLAER et al., 2014). Depois deste período, todo esse subproduto gerado não tem mais utilidade e é vendido/reaproveitado para uso agrícola (adubação) (informação dos produtores de frango de corte). Os fármacos ali acumulados são então descarregados no ambiente.

DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DA ATIVIDADE AVÍCOLA

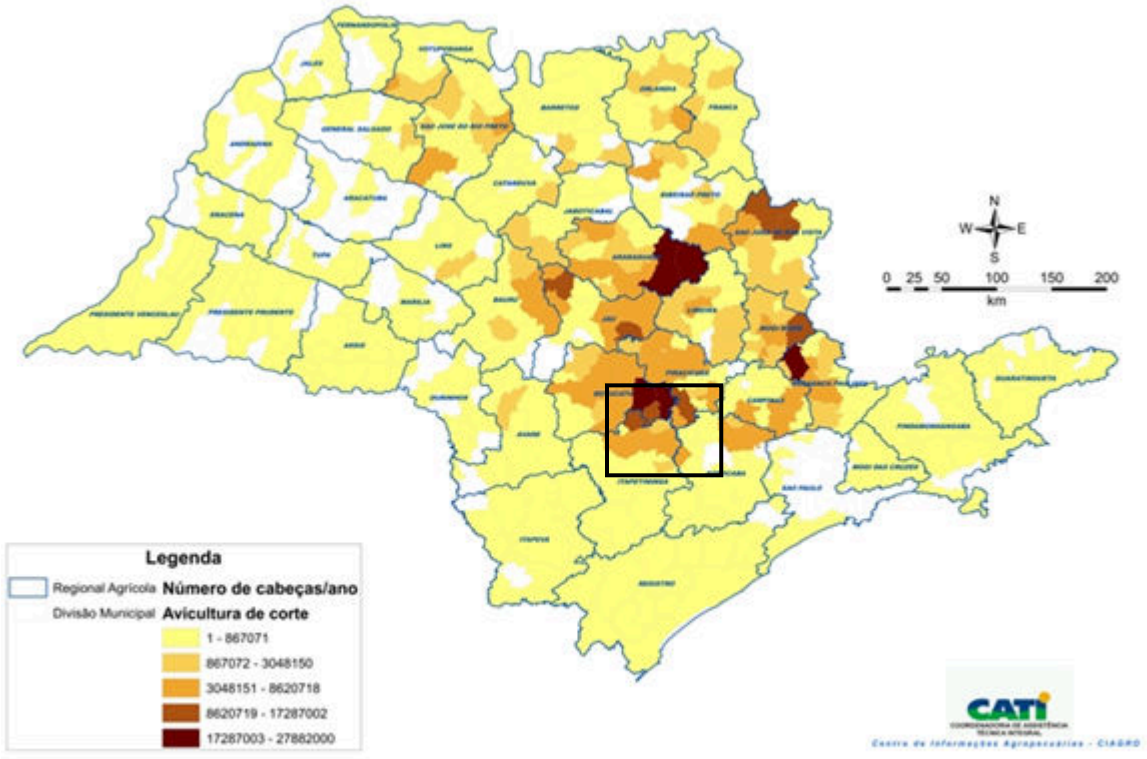


Figura 2.1 - Distribuição espacial da avicultura de corte no Estado de São Paulo nos anos de 2007/08.

Os municípios de Piracicaba, Saltinho e Tietê (SP/Brasil) produzem juntos quase 20 milhões de cabeças de frango por ano (Tabela 2.2), mas ainda não há dados oficiais sobre a produção e destino final da cama de aviário.

Tabela 2.2 - Avicultura de corte no Estado de São Paulo, Regional de Piracicaba e municípios de Piracicaba, Saltinho e Tietê (2007/08).

LOCAL	Nº de UPAS *	TOTAL (cabeças ano^{-1})
Estado de São Paulo	14.202	580.469.195
Regional de Piracicaba	334	45.512.919
Piracicaba	54	5.187.290
Saltinho	7	553.000
Tietê	87	13.723.300

*Unidade de Produção Agropecuária
Fonte: Secretaria de Agricultura e Abastecimento, CATI/IEA, Projeto LUPA.

Devido suas propriedades físico-químicas, as FQs se acumulam nos solos devido a adsorção e persistem no ambiente por longos períodos (GOLET et al., 2002; MARTINEZ-CARBALLO et al., 2007; KARCI, BALCIOGLU, 2009; GOTTSCHALL et al., 2012; VAN DOORSLAER et al., 2014). Os antimicrobianos dos grupos das tetraciclinas e FQs são os que apresentam os maiores coeficientes de sorção (K_d = 70 - 5000 L kg^{-1}), sendo considerados imóveis no perfil de solo (TOLLS, 2001).

Há estudos que relacionam a persistência de FQs com o pH do solo (VASUDEVAN et al., 2009), uma vez que esses compostos são anfóteros, com vários grupos funcionais ionizáveis (diferentes valores de pKa) e, dependendo do pH do solo, apresentam grupos catiônicos ou aniônicos (GU, KARTHIJEYAN, 2005). Assim, em solos com pH mais baixos (solos tropicais) há prevalência das formas catiônicas das FQs, aumentando a adsorção entre esses compostos e os solos com alta capacidade de troca catiônica (CTC) (PICÓ; ANDRÉU, 2007).

Sabe-se que as FQs são capazes de formar complexos estáveis com íons metálicos divalentes e trivalentes, principalmente com o cálcio (Ca^{+2}) e o magnésio (Mg^{+2}) (TURIEL et al., 2006). Em solos saturados por bases, a dessorção dessas moléculas é prejudicada (STURINI et al, 2010), dificultando sua mobilidade no solo e aumentando a sua persistência. A combinação entre mobilidade e persistência é que determina se o composto será degradado durante seu período de permanência no solo (LOURENCETTI et al., 2007).

Essas moléculas apresentam grande estabilidade e são pouco susceptíveis à degradação. Algumas formas de degradação de FQs são a oxidação por óxidos de manganês (ZHANG et al., 2009) e absorção eletrostática (ALEXANDER, 2000), mas elas são mais vulneráveis à fotólise (TERNES, 2001; MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; KÜMMERER, 2009 WAMMER et al., 2013; BARTOSKOVA et al., 2014; STURINI et al., 2015). Ressalta-se que as FQs não sofrem alterações em sua estrutura química sob aeração,

variação de temperatura (10 - 55° C) ou durante o processo de compostagem, podendo dispersar-se em sua forma inalterada (RODRIGUES-SILVA et al., 2014) e causar contaminação ambiental. Esses fármacos também são bastante resistentes à degradação microbiana (KÜMMERER, MERSCH-SUNDERMANN, 2000).

2.5 Contaminação em matrizes ambientais

Os solos são considerados os reservatórios primários da biodiversidade e os microrganismos representam uma fração considerável dessa biodiversidade (TORSVIK; OVREÅS, 2002; ALLISON, MARTINY, 2008). Um grande número de estudos tem documentado como a estrutura da comunidade microbiana e os diferentes tipos de microrganismos e suas abundâncias constituem um elemento essencial para a compreensão dos impactos das perturbações ambientais e antrópicas no funcionamento do solo (FUHRMAN, 2009). No entanto, ainda há poucos trabalhos relacionando medicamentos veterinários, a estrutura da comunidade microbiana e os solos.

Hoje em dia mais de 5.000 compostos farmacêuticos destinados a aplicações em humanos e animais são utilizados no mundo (DORIVAL-GARCÍA et al., 2013). Apesar de seus benefícios, há uma crescente preocupação com potenciais efeitos adversos na biota e na saúde humana (KÜMMERER, 2009; RIZZO et al., 2013; TIJANI et al., 2013). Devido ao aumento das necessidades globais e descarga inadequada, os fármacos são detectados em várias matrizes ambientais (WANG et al., 2011). Entre 1997 e 2009, as FQs foram a segunda classe de resíduos farmacêuticos mais detectados (15%) no ambiente (MARTINS et al., 2012).

A presença de medicamentos e seus metabólitos no ambiente aquático são relatados desde o início da década de 1980 (ANDREOZZI et al., 2003; WEBB et al., 2003). A persistência de FQs no ambiente implica em potencial exposição humana indireta aos produtos farmacêuticos através de abastecimento de água potável e resíduos em alimentos irrigados com água contaminada com fármacos (WEBB et al., 2003).

Além da contaminação de águas superficiais, as águas subterrâneas também são vulneráveis devido a atividades urbanas e da indústria, mesmo que o solo forneça grande inércia para mudanças de qualidade e retarde a propagação da contaminação. Por esse mesmo motivo a contaminação das águas subterrâneas é um processo de difícil reversão (LÓPEZ-SERNA et al., 2012).

Apesar dos trabalhos mostrarem contaminação em diversas matrizes ambientais, os relatos mais comuns de contaminação por FQs se concentram em corpos d'água (DONG et

al., 2009; LIU et al., 2009; SUN et al., 2009; ELMOLLA; CHAUDHURI, 2010; JEONG et al., 2010; RODRIGUEZ et al., 2012; VERLICCHI et al., 2012), mesmo que os sedimentos sejam os primeiros substratos que sofram acúmulo de antimicrobianos em um corpo hídrico (MICHAEL et al., 2012). Há relatos que indicam que as concentrações de FQs em sedimentos são maiores do que em água, mas em água são encontrados mais compostos de diferentes classes de fármacos (MARTI et al., 2014). Esse acúmulo deve-se à capacidade das FQs se ligarem aos solos e sedimentos, o que retarda o processo de sua biodegradação (MARTINEZ, 2009). No entanto, esse acúmulo pode contribuir para a manutenção de um reservatório ambiental dos genes resistentes, o que seria uma vantagem para bactérias aquáticas para crescer sob baixas concentrações desses antimicrobianos (MARTI et al., 2014).

2.6 Microbiota do solo

A resistência aos antimicrobianos não é um fenômeno recente, pois a primeira cepa resistente à penicilina foi isolada em 1940, apenas alguns anos após a introdução deste composto no tratamento de seres humanos (LEVY, 2002). No entanto, este fato foi ignorado porque os patógenos resistentes poderiam ser tratados com os novos antimicrobianos desenvolvidos ao longo dos anos 1950 e 1960. Hoje em dia, com o aumento de bactérias resistentes e as dificuldades na produção de novos antibióticos, o desenvolvimento de resistência tornou-se uma preocupação de saúde global (MARTI et al., 2014).

A resistência a antimicrobianos em patógenos humanos e animais surgiu com a introdução de fármacos em ambientes antrópicos (COLOMER-LLUCH et al., 2014a; COLOMER-LLUCH et al., 2014b), sendo considerado um dos maiores problemas de saúde pública e animal atualmente (BILA; DEZOTTI, 2003). A exposição prolongada a baixas doses de antimicrobianos pode causar mutações em bactérias e o desenvolvimento de resistência aos fármacos (BOWER; DAESCHEL; 1999), como também pode selecionar grupos resistentes que possuem a capacidade de transferir genes de resistência a outras espécies de bactérias (BOXALL et al., 2003; VELICU; SURI, 2009; COLOMER-LLUCH et al., 2014a).

Em informações emitidas pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) dos Estados Unidos, no ano de 2013, estima-se que pelo menos 2 milhões de pessoas são infectadas com bactérias resistentes a fármacos por ano e pelo menos 23 mil morrem como resultado direto dessas infecções. Sabe-se que muitas outras mortes são decorrentes de complicações das infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos.

Um dos problemas observados tem sido a modificação da estrutura da comunidade microbiana do solo (MIGLIORE et al., 1995). Fertilizar solos com dejetos de animais provenientes de explorações agrícolas com uso de fármacos veterinários representa um risco de disseminação de genes de resistência no ambiente, quer pela escolha de populações resistentes ou através da transferência horizontal de genes (KYSELKOVA et al., 2009).

Estima-se que 10^6 e 10^9 bactérias por grama de solos cultiváveis e florestais, respectivamente, sejam responsáveis pela imobilização de minerais e processos naturais de decomposição. Com a morte destes microrganismos a capacidade do solo em degradar contaminantes como os fármacos seria prejudicada (PEREIRA et al., 2012)

As bactérias não vivem isoladamente, elas são facilmente dispersadas pelo mundo por seres humanos, animais, plantas, solo, água e ar. Assim, a água é uma via de exposição subvalorizada para a disseminação da resistência aos antimicrobianos. Várias bactérias resistentes já foram detectadas em fontes de água, incluindo a água potável (FINLEY et al., 2013). Esta é uma das principais preocupações dos países em desenvolvimento e tem sido uma das principais vias para a transmissão de bactérias patogênicas para as pessoas nos países desenvolvidos (XI et al., 2009; CZEKALSKI, et al., 2012; LUPO et al., 2012; KOCZURA et al., 2012).

A fim de proteger a saúde humana e manter o desenvolvimento sustentável da economia animal/vegetal é necessário tomar medidas que atenuem a poluição dos fármacos no ambiente.

2.7 Toxicidade aguda em organismos aquáticos

Como antimicrobianos são detectados rotineiramente em águas residuais e superficiais há grandes chances de causar efeitos adversos na biota aquática (KOLPIN et al., 2003, BROOKS et al., 2005; KWON et al., 2009). Sabendo-se que as FQs são persistentes no ambiente, pressupõe-se que a exposição dos organismos aquáticos a estes compostos será em longo prazo (DAUGHTON, TERNES, 1999). Assim, cada dia há mais dados na literatura que avaliam a toxicidade aguda e crônica de organismos aquáticos a diversos fármacos presentes no ambiente (CARLSSON et al., 2009). A compreensão dos potenciais efeitos de xenobióticos em invertebrados/vertebrados é um componente essencial para a avaliação do risco ambiental.

O teste agudo mede os efeitos adversos de contaminantes em amostras ambientais durante um curto período de tempo que varia geralmente entre 0 e 96 horas, sendo possível determinar para peixes e microcrustáceos, entre outros, a concentração letal média para 50%

(CL_{50}) dos indivíduos expostos. Para microcrustáceos, pode ainda ser avaliado o efeito agudo através da concentração efetiva média para 50% dos indivíduos (CE_{50}), sendo que neste caso o parâmetro analisado é a imobilidade dos organismos e não a morte (RAND, PETROCELLI, 1984).

Os testes de toxicidade geralmente são realizados com o microcrustáceo *Daphnia sp.*, pois eles são a base da cadeia alimentar, servindo como fonte de alimento para os anfíbios, peixes e outros organismos aquáticos (CONSTANTINE, HUGGETT, 2010) e o peixe *Danio rerio* (peixe paulistinha) é usado pois apresenta grande adaptabilidade, podendo sobreviver em diferentes condições ambientais e se reproduzir facilmente em ambiente artificial (GERGER et al., 2015).

Assim como é necessário proteger a saúde humana, mitigar os problemas de contaminação em solos e evitar o desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes, também é urgente a tomada de medidas que atenuem a contaminação dos fármacos nos corpos hídricos.

Referências

ALEXANDER, M. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 34, n. 20, p. 4259-4265, Oct 2000.

ALLISON, S. D.; MARTINY, J. B. H. Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA,** Washington, DC, v. 105, p. 11512-11519, Aug 2008.

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere,** Oxford, v. 50, n. 10, p. 1319-1330, Mar 2003.

BAKKEN, J. S. The fluoroquinolones: How long will their utility last? **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, Stockholm, v.36, n.2, p.85-92, 2004

BARRON, D.; JIMENEZ-LOZANO, E.; BAILAC, S.; BARBOSA, J. Determination of difloxacin and sarafloxacin in chicken muscle using solid-phase extraction and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Amsterdam, v.767, n.2, p.313-319, Feb 2002.

BARTOSKOVA, M.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; PANA, O.; ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P. Norfloxacin-Toxicity for Zebrafish (*Danio rerio*) Focused on Oxidative Stress Parameters. **Biomed Research International**, New York, Mar 2014.

BENGTSSON-PALME, J.; BOULUND, F.; FICK, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D.G.J Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 5, p. 14, Dec 2014.

BILA, D. M.; DEZOTTI, M. Fármacos no Meio Ambiente. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 523-530, jul-aug 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação animal**: Aves. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 21 fev. 2015.

BOWER, C. K.; DAESCHEL, M. A. Resistance responses of microorganisms in food environments. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 50, p. 33-44, Sep 1999.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SORENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science & Technology,** Easton, v.37, p.286-294, Aug 2003.

BROOKS, B.W.; CHAMBLISS, C.K.; STANLEY, J.K.; RAMIREZ, A.; BANKS, K.E.; JOHNSON, R.D.; LEWIS, R.J. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 24, n. 2, p. 464-469, Feb 2005.

CAO, Z.Z.; LIU, R.T.; DONG, Z.L.; YANG, X.P.; CHEN, Y.D. The effect of sarafloxacin on Cu/ZnSOD structure and activity. **Spectrochimica Acta Part A-Molecular and Biomolecular Spectroscopy,** Kidlington**,** v. 136, p. 601-606, Feb 2015.

CARLSSON, G.; ORN, S.; LARSSON, D. G. J. Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 12, p. 2656-2662, Dec 2009.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDP. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Acesso em: 21 fev. 2015.

COLOMER-LLUCH, M.; CALERO-CACERES, W.; JEBRI, S.; HMAIED, F.; MUNIESA, M.; JOFRE, J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. **Environment International,** Elmsford, v. 73, p. 167-175, Dec 2014.

COLOMER-LLUCH, M.; IMAMOVIC, L.; JOFRE, J.; MUNIESA, M. Bacteriophages carrying antibiotic resistance genes in fecal waste from cattle, pigs, and poultry. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, DC, v. 55, p. 4908-4911, Jul 2014.

CONSTANTINE, L.A.; HUGGETT, D.B.A. Comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemosphere,** Oxford, v. 80, n. 9, p. 1069-1074, Aug 2010.

CORDENADORIA DE ASSITENCIA TECNICA INTEGRAL - CATI. **Levantamento Censitário de Unidades de Produção Agropecuárias** (LUPA). Campinas, SP. Disponível em: <http://www.cati.sp.gov.br/projetolupa/>. Acesso em: 21 fev. 2015.

CZEKALSKI, N.; BERTHOLD, T.; CAUCCI, S.; EGLI, A.; BÜRGMANN, H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 106, Mar 2012.

DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspective**, Research Triangle Park, v. 107, p. 907-938, Dec 1999.

DÍAZ-CRUZ, M.S.; DE ALDA, M.J.L.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v.22, p.340-351, Jun 2003.

DONG, J.; LI, Y.T.; ZHANG, L.J.; LIU, C.S.; ZHUANG, L.; SUN, L.N. The oxidative degradation of sulfadiazine at the interface of alpha-MnO_2 and water. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** Chichester Sussex, v.84, p.1848-1853, Dec 2009.

DORIVAL-GARCÍA, N.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; NAVALÓN, A.; GONZÁLEZ, J., VILCHEZ, J. L. Removal of quinolone antibiotics from wastewaters by sorption and biological degradation in laboratory-scale membrane bioreactors. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 442, p. 217-328, Jan 2013.

ELMOLLA, E.S.; CHAUDHURI, M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.173, p.445-449, Jan 2010.

EMBRAPA. **Aspectos da produção, exportação, consumo e custos de produção e implantação de aviários**. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2003. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Ave/ProducaodeFrangodeCorte/Importancia-economica.html>. Acesso em: 21 fev. 2015.

FICK, J.; SODERSTROM, H.; LINDBERG, R.H.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D.G.J. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, Dec 2009.

FINLEY, R.L.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D.G.J.; MCEWEN, S.A.; LI, X.Z.; GAZE, W.H.; The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.57, p.704-710, Sep 2013.

FUHRMAN, J. A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature,** London, v. 459, n. 7244, p. 193-199, May 14 2009.

GERGER, C.J.; THOMAS, J.K.; JANZ, D.M.; WEBER, L.P. Acute effects of beta-naphthoflavone on cardiorespiratory function and metabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Physiology and Biochemistry,** Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 289-298, Feb 2015.

GOLET, E.M.; STREHLER,A.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v.74, p.5455-5462, Nov 2002.

GOTTSCHALL, N.; TOPP, E.; METCALFE, C.; EDWARDS, M.; PAYNE, M.; KLEYWEGT, S.; RUSSELL, P.; LAPEN, D.R. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. **Chemosphere,** Oxford, v. 87, n. 2, p. 194-203, Apr 2012.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K. G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 39, n. 23, p. 9166-9173, Dec 2005.

HALLING-SORENSEN, B.; NIELSEN, S.N.; LANZKY, P.F.; INGERSLEV, F.; LÜTZHOFT, H.C.H.; JORGENSEN, S.E.Occurrence, fate and effects of pharmaceuticals in the environment. A review. **Chemosphere**, Oxford, v.36, n. 2, p.357-393, Jan 1998.

HARTMANN, A.; ALDER, A.C.; KOLLER, T.; WIDMER, R.M. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. **Environmental Toxicology and Chemistry,** New York, v. 17, n. 3, p. 377-382, Mar 1998.

HE, K.; BLANEY, L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 282, p. 96-105, Jan 2015.

HOOPER, D. C. Mode of action of fluoroquinolones. **Drugs,** New York, v. 58, p. 6-10, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Abate de animais, produção de couro, leite e ovos**: Tabelas: Animais abatidos e peso de carcaças. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201403_1.shtm. Acesso em: 21 fev. 2015.

JEONG, J.; SONG, W.H.; COOPER, W.J.; JUNG, J.; GREAVES, J. Degradation of tetracycline antibiotics: mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. **Chemosphere.** Oxford, v. 78, p.533-540, Jan 2010.

KARCI, A.; BALCIOGLU, I.A. Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Scienceof theTotal Environment**, Amsterdam, v. 407, p. 4652-4664, May 2009.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, New York, v. 8, p.1-13, Jan 2008.

KOCZURA, R.; MOKRACKA, J.; JABŁOŃSKA, L.; GOZDECKA, E.; KUBEKM, K.A. Antimicrobial resistance of integron-harboringEscherichia coli isolates from clinical samples, wastewater treatment plant and river water. **Scienceof the Total Environment,** Amsterdam, v. 414, p. 680-6855, Jan 2012.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Response to comment on "pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance". **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, n. 5, p. 1054-1054, Mar 2003.

KUEMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. **Chemosphere,** Oxford, v. 75, n. 4, p. 435-441, Apr 2009.

KUEMMERER, K.; AL-AHMAD, A.; MERSCH-SUNDERMANN, V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. **Chemosphere,** Oxford, v. 40, n. 7, p. 701-710, April 2000.

KYSELKOVA, M.; KOPECKY, J.; FRAPOLLI, M.; DEFAGO, G.; SAGOVA-MARECKOVA, M.; GRUNDMANN, G.L.; MOENNE-LOCCOZ, Y. Comparison of rhizobacterial community composition in soil suppressive or conducive to tobacco black root rot disease. **ISME Journal**, London, v. 3, p. 1127-1138, Oct 2009.

LEVY, S.B. **The antibiotic paradox**: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers.Cambridge, MA: Perseus Publishing, 2002. 353p.

LI, Y.X.; ZHANG, X.L.; LU, W.L.; BEI, L.X.F.; WANG, J. The residues and environmental risks of multiple veterina antibiotics in animal faeces. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, p. 2211-2220, Mar 2013.

LINDBERG, R.H.; WENNBERG, P.; JOHANSSON, M.I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B.A.V. Screening of human antibiotic substances and determination of weekly mass flows in five sewage treatment plants in Sweden. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 39, n. 10, p. 3421-3429, May 2005.

LIU, C.S.; ZHANG, L.J.; LI, F.B.; WANG, Y.; GAO, Y.; LI, X.Z. Dependence of sulfadiazine oxidative degradation on physicochemical properties of manganese dioxides. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** Washington, DC, v.48, p. 10408-10413, Dec 2009.

LÓPEZ-SERNA, R.; POSTIGO, C.; BLANCO, J.; PÉREZ, S.; GINEBREDA, A.; LÓPEZ DE ALDA, M. Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on the presence emerging contaminants in a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain). **Environmental Science and Pollution Research,** Heidelberg, v.19, p.1000-1012, May 2012.

LOURENCETTI, C.; FAVORETO, R.; MARCHI, M.R.R.; RIBEIRO, M.L. Residues of organochlorine pesticides and PCBs in some Brazilian municipal solid waste compost. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, London, v.42, p. 697-705, Aug 2007.

LUPO, A.; COYNE, S.; BERENDONK, T. U. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, 2012.

MARTI, E.; HUERTA, B.; RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELO, D.; JOFRE, J.; BALCAZAR, J.L. Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. **Water Research**, Oxford, v. 61, p. 67-76, Sep 2014.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, London, v.157, p.2893–2902, Nov 2009.

MARTINEZ-CARBALLO, E.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution,** London, v. 148, n. 2, p. 570-579, Jul 2007.

MARTINS, N.; PEREIRA, R.; ABRANTES, N.; PEREIRA, J.; GONCALVES, F.; MARQUES, C.R. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 4, p. 1167-1176, May 2012.

MICHAEL, I.; HAPESHI, E.; MICHAEL, C.; VARELA, A.R.; KYRIAKOU, S.; MANAIA, C.M.; FATTA-KASSINOS, D. Solar photo-Fenton process on the abatement of antibiotics at a pilot scale: Degradation kinetics, ecotoxicity and phytotoxicity assessment and removal of antibiotic resistant enterococci. **Water Research,** Oxford, v. 46, n. 17, p. 5621-5634, Nov 2012.

MIGLIORE, L.; BRAMBILLA, G.; COZZOLINO, S.; GAUDIO, L .Effects on plants of sulphadimethoxine used in intensive farming (*Panicum miliaceum, Pisum sativum* and *Zea mays*). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 52, p.103-110, Feb 1995.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p.1229-1235, 2005.

MORALES-GUTIERREZ, F. J.; BARBOSA, J.; BARRON, D. Metabolic study of enrofloxacin and metabolic profile modifications in broiler chicken tissues after drug administration. **Food Chemistry**, Barking, v. 172, p. 30-39, Apr 2015.

MORARU, R.; POURCHER, A.M.; JADAS-HECART, A.; KEMPF, I.; ZIEBAL, C.; KERVARREC, M.; COMUNAL, P.Y.; MARES, M.; DABERT, P. Changes in Concentrations of Fluoroquinolones and of Ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae in Chicken Feces and Manure Stored in a Heap. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 41, n. 3, p. 754-763, May-Jun 2012.

PEREIRA, L.A.; JARDIM, I.C.S.F.; FOSTIER, A.H.; RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, São Paulo, v.35, n.1, p.159-169, Sep 2012.

PICO, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil - risks and challenges. **Analytical and BioAnalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, Feb 2007.

POURCHER, A.M.; JADAS-HECART, A.; COTINET, P.; DABERT, P.; ZIEBAL, C.; LE ROUX, S.; MORARU, R.; HEDDADJ, D.; KEMPF, I. Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of Enterobacteriaceae in soil. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 482, p. 269-275, Jun 2014.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Washington, DC: Hemisphere, 1984. 665p.

RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M.C.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 447, p. 345-360, Mar 2013.

RODRIGUES-SILVA, C.; MANIERO, M.G.; GUIMARAES, J.R. Evaluation of residual antimicrobial activity of flumequine solutions subjected to electrochemical and photo-electrochemical processes. **Química Nova,** São Paulo, v. 37, n. 5, p. 789-795, Jun 2014.

RODRIGUEZ, A.; MUNOZ, I.; PERDIGON-MELON, J.A.; CARBAJO, J.B.; MARTINEZ, M.J.; FERNANDEZ-ALBA, A.R. Environmental optimization of continuous flow ozonation for urban waste-water reclamation. **Scienceof theTotal Environment,** Amsterdam, v.437, p. 68-75, Oct 2012.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.725-759, Oct 2006.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, Sep 2011.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PRETALI, L.; MALAVASI, L.; PROFUMO, A.; FASANI, E.; ALBINI, A. Sunlight photodegradation of marbofloxacin and enrofloxacin adsorbed on clay minerals. **Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry**, Amsterdam, v. 299, p. 103-109, Feb 2015.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PROFUMO, A. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1217, n. 47, p. 7316-7322, Nov 2010.

SUN, S.P.; GUO, H.Q.; KE, Q.; SUN, J.H.; SHI, S.H.; ZHANG, M.L. Degradationof antibiotic ciprofloxacin hydrochloride by photofenton oxidation process. **Environmental Engineering Science**, New Rochelle, v. 26, p. 753–759, Mar 2009.

TEIJON, G.; CANDELA, L.; TAMOH, K.; MOLINA-DÍAZ, A.; FERNÁNDEZ-ALBA, A.R. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). **Science of the Total Environmen**t, Amsterdam, v. 408, n. 17, p. 3584-3595, Aug 2010.

TERNES, T.A. Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 20, n. 8, p. 419-434, Aug 2001.

TIJANI, J. O.; FATOBA, O. O.; PETRIK, L. F. A Review of Pharmaceuticals and Endocrine-Disrupting Compounds: Sources, Effects, Removal, and Detections.**Water Air and Soil Pollution,** Dordrecht, v. 224, n. 11, Nov 2013.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, Sep 1 2001.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v.5, p. 240-245, Jun 2002.

TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, Mar 2006.

VAN DOORSLAER, X.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 500, p. 250-269, Dec 2014.

VASUDEVAN, D.; BRULAND, G.L.; TORRANCE, B.S.; UPCHURCH, V.G.; MACKAY, A. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. **Geoderma**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 68-76, Jul 2009.

VELICU, M.; SURI, R. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 154, n. 1-4, p. 349-359, Jul 2009.

VERLICCHI, P.; AL AUKIDY, M.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Scienceof theTotal Environment**, Amsterdam, v.430, p. 109-118, Jul 2012.

WAMMER, K.H.; KORTE, A.R.; LUNDEEN, R.A.; SUNDBERG, J.E.; MCNEILL, K.; ARNOLD, W.A. Direct photochemistry of three fluoroquinolone antibacterials: Norfloxacin, ofloxacin, and enrofloxacin. **Water Research**, Oxford, v. 47, n. 1, p. 439-448, Jan 2013.

WANG, C.-J.; LI, Z.; JIANG, W.-T. Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 53, n. 4, p. 723-728, Oct 2011.

WEBB, S.; TERNES, T.; GIBERT, M.; OLEJNICZAK, K Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 157-167, May 2003.

XI, C.; ZHANG, Y.; MARRS, C.F. Prevalence of antibiotic resistance in drinking water treatment and distribution systems. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v.75, p. 5714-5718, Sep 2009.

XIE, Y.F.; LI, X.W.; WANG, J.F.; CHRISTAKOS, G.; HU, M.G.; AN, L.H. Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.430, p.126-131, Jul 2012.

ZHANG, J.; LI, Z.; GE, G.; SUN, W.; LIANG, Y.; WU, L. Impacts of soil organic matter, pH and exogenous copper on sorption behavior of norfloxacin in three soils. **Journal of Environmental Sciences,** Beijing, v. 21, n. 5, p. 632-640, 2009.

ZUCCATO, E.; CASTIGLIONI, S.; BAGNATI, R.; MELIS, M.; FANELLI, R. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment**. Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 179, n. 1-3, p. 1042-1048, Jul 2010.

3. Determinação de fluoroquinolonas em cama de aviário e solos e alteração na estrutura da comunidade microbiana

Resumo

O Brasil é o maior exportador mundial de carne de frango e a cama de aviário é um dos principais resíduos sólidos, sendo comumente utilizado como fertilizante agrícola. Este resíduo pode conter quantidades significativas de antimicrobianos que podem causar impacto ambiental até hoje pouco investigado. Acredita-se que o uso constante desses antimicrobianos em frangos possa causar a morte de populações de microrganismos do solo, diminuindo a atividade microbiana, a abundância e modificando a estrutura da comunidade bacteriana dos mesmos em locais onde esteja sendo aplicada ou descartada a cama de aviário. Com isso, o objetivo deste trabalho foi quantificar três antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas (FQs): norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e ciprofloxacina (CIP) em condições reais de produção e avaliar a consequência do contato deste resíduo com a comunidade microbiana do solo. Foi realizado um mapeamento das granjas da região de Piracicaba/SP e seis foram selecionadas para coleta de amostras de cama de aviário e solo. A determinação dos antimicrobianos nas amostras foi realizada pela técnica de cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos/ultravioleta (HPLC-DAD/UV). A atividade microbiana dos solos foi determinada pelo método da radiorespirometria utilizando ^{14}C-glicose. A estrutura e abundância da comunidade bacteriana do solo foram determinadas pelas técnicas da Reação em Cadeia da Polimerase - Eletroforese em Gel de Gradiente Desnaturante (PCR/DGGE) e da PCR em tempo real (*q*PCR), respectivamente. Foram encontradas concentrações entre 1,20 e 8,31 mg kg^{-1} de FQs em cama de aviário, havendo o acúmulo desses fármacos com seu tempo de uso (até 135 dias). Nos solos, as concentrações de FQs encontradas variaram entre 10,2 e 325 µg kg^{-1}, valores acima dos níveis tolerados (100 µg kg^{-1}). Não foram observados efeitos diretos na atividade microbiana por meio da avaliação da mineralização da ^{14}C-glicose. No entanto, tais níveis reduziram a abundância e modificaram a estrutura da comunidade bacteriana em determinadas granjas. Ao concluir que a cama de aviário contendo FQs pode afetar a abundância e a estrutura da comunidade bacteriana do solo, medidas paliativas simples como a sua exposição direta à luz solar antes da sua aplicação como fertilizante, apresenta-se como uma alternativa viável devido a fotossensibilidade desses fármacos.

Palavras-chave: Antimicrobianos. Contaminação ambiental. Microrganismos do solo.

Abstract

Brazil is the largest exporter of poultry meat and poultry litter is a solid waste that is commonly used as agricultural fertilizer. This waste can contain significant amounts of antimicrobials that may impact the environment. It is believed that the constant use of these antibiotics in chickens may cause disturbance in soil microorganisms population, reducing microbial activity, abundance and diversity of these population in places where poultry litter is being applied or discarded. Thus, the objective of this study was to quantify three antimicrobial of fluoroquinolones (FQs) group: norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in real production conditions and to evaluate the result of the poultry litter contact with soil microbial community. We conducted a mapping of farms in Piracicaba/SP region and six farms were selected for collecting manure samples and soil. The determination of the antimicrobial in samples was performed by high performance liquid chromatography with diode array/ultraviolet detection (HPLC-DAD/UV). The microbial activities in soils were determined by radiorespirometry method using ^{14}C-glucose. The diversity and abundance of soil bacterial community were determined by the techniques of Polymerase Chain Reaction/Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR/DGGE) and real-time PCR (qPCR), respectively. There were found concentrations between 1.20 and 8.31 mg kg^{-1} of FQs in poultry litter and its accumulated on the time (up to 135 days). In soils, the concentrations of FQs ranged from 10.2 to 325 µg kg^{-1}, these values were higher than the tolerated (100 µg kg^{-1}). There were no direct effects on soil microbial activity by evaluating the mineralization of ^{14}C-glucose. However, these levels reduced the abundance and diversity of the bacterial community in certain farms. It was concluded that the poultry litter containing FQs may affect the abundance and diversity of soil bacterial community. Simple action such as solar exposure before application as manure is presented as a viable alternative due to photosensitivity of FQs.

Keywords: Antimicrobials. Environmental contamination. Soil microorganisms.

3.1 Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango do mundo (BRASIL, 2015), com mais de 5,5 bilhões de animais abatidos no ano de 2014 (IBGE, 2015). Também considerado "o celeiro do mundo", o Brasil depende da importação de grande parte dos fertilizantes minerais para a produção agrícola e, consequentemente, tem-se buscado insumos alternativos, diminuindo custos de produção. Com a crescente poluição ambiental, destaca-se a necessidade de mais pesquisas para avaliar a viabilidade técnica e econômica da utilização de resíduos orgânicos (MELO et al., 2008).

Em muitas regiões existe a possibilidade de aproveitamento de resíduos, os quais constituem opção interessante quando bem utilizados. O uso de estercos animais pode favorecer a infiltração e a absorção da água e aumentar a capacidade de troca de cátions dos solos (HOFFMANN et al., 2001; CARVALHO, 2011). A cama de aviário vem sendo muito bem aceita pelos produtores como adubo orgânico na agricultura, pois contém muitos nutrientes, principalmente nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) com ampla aplicação, por exemplo, na adubação de pastagens, hortaliças, sorgo e soja (ADELI et al., 2005), milho (BOATENG et al., 2006), algodão (ADELI et al., 2007) e cana-de-açúcar. No entanto, alguns estudos apontaram que os resíduos dos aviários podem ser considerados poluentes dos solos, pois contém os antimicrobianos aplicados durante a produção (OVIEDO-RONDÓN, 2008). Os antimicrobianos do grupo das FQs são os mais utilizados na criação de aves de corte, no entanto podem causar efeitos tóxicos na microbiota dos solos. Sabe-se que a presença de fármacos veterinários em solo por longo período pode afetar a composição e a atividade da microbiota presente (GIRARDI et al., 2011).

A cada ano são realizadas de 6 a 8 aplicações desses fármacos em aproximadamente 15.000 cabeças de frango/granjada e todo resíduo, metabolizado ou não, é descartado na cama de aviário. Esses substratos são comumente dispostos em contato com o solo sem nenhuma proteção a cada troca ou exposição da palhada ao sol (que ocorre a cada troca da granjada em alguns galpões). Assim, esses medicamentos presentes na cama de aviário atingem os solos causando contaminação e interferindo na comunidade bacteriana.

Acredita-se que a atual utilização de FQs na produção de frango de corte eleva os teores destes fármacos/metabólitos da cama de aviário em concentrações passíveis de gerar contaminação e consequentemente um efeito deletério na comunidade ou na atividade bacteriana do solo. Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar os teores de FQs em cama de aviário e solos (em condições reais de produção) e seus efeitos na microbiota do solo.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Seleção das granjas e questionário para os produtores

Seis granjas de produção de frango de corte da região de Piracicaba foram selecionadas para o estudo, conforme o preenchimento de um questionário (Figura 3.1). Os principais critérios de seleção foram: disponibilidade dos produtores; granjas com número heterogêneo de frangos ano^{-1}; locais com drenagem do barracão para pequenas represas e tipos de solo. Os compostos para estudo foram selecionados de acordo com o histórico de uso pelos produtores no ano de 2011.

PRODUTOR:																			
TEL:						LOCALIZAÇÃO:						INTEGRADORA:							
Há quantos anos o galpão mais antigo está em funcionamento?						Número médio de granjadas por galpão/ano (n)						Possui pedilúvio ou outros métodos para evitar contaminação?							
						2	3	4	5	6	7								
Número de galpões (n)						Número de animais por granjada (cabeças)						Freqüência da compostagem da cama (n)							
1	2	3	4	5								0	1	2	3	4	5		
Mortalidade média/granjada (cabeças)						Tipo de forração utilizada						Destino final da cama de frango							
pintos (chegada):						mrv	carz	catr	camd			Uso prop	vende	Adubo	Ração	Desc	Usina		
criação (até saída):						outro:						outro:							
Duração da granjada (dias)						Quantas vezes a cama de frango é reutilizada (n/ano)						Outras medidas de profilaxia							
						1	2	3	4	5	6								
Qual a época da lavagem do galpão (quando essas apresentavam piso de cimento)						Quais antimicrobianos estão aplicando atualmente						Na opinião do produtor, a mortalidade relativa de frangos nos últimos anos devido a doenças							
jan	fev	mar	abr	mai	jun	Nor	Enr	Cpf	Smz	Sdz	Tmp	diminuiu		estável		cresceu			
jul	ago	set	out	nov	dez	outro:													

Figura 3.1 - Questionário/levantamento destinado aos produtores de frango de corte dos municípios de Piracicaba, Saltinho e Tietê (SP/Brasil).

3.2.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em cama de aviário

Foram realizadas análises de cama de aviário de duas formas: aleatório e específico. Aleatório: foram realizadas amostragens em seis granjas selecionadas no mesmo dia, independente da granjada. Específico: em uma destas granjas foram realizadas amostragens em 4 momentos distintos: 0, 45, 90 e 135 dias após a distribuição da cama de aviário no barracão.

Coleta de cama de aviário

A) Comparativo entre granjas

As amostragens foram realizadas nas granjas selecionadas em três pontos distintos dentro dos galpões e, em cada ponto de coleta, foram realizadas três subamostragens. As amostras de cama de aviário (Figura 3.2) foram homogeneizadas e levadas ao Laboratório de Ecotoxicologia no Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo (CENA/USP) onde foram liofilizadas, moídas, extraídas e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC-DAD). Uma porção de cada amostra (aproximadamente 300 g) foi enviada ao Laboratório de análises químicas Pirasolo - Laboratório Agrotécnico Piracicaba S/C Ltda para análise química: N, P, K, cálcio (Ca), magnésio (Mg) e enxofre (S).

Figura 3.2 - Cama de aviário

B) Durante um período de produção

Dentre as granjas, uma foi selecionada aleatoriamente e foram realizadas coletas em três momentos distintos: cama de aviário antes da aplicação de antimicrobianos (tempo 0); após a 1ª granjada (45 dias); após a 2ª granjada (90 dias) e após a 3ª granjada (135 dias).

3.2.2.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em solo

Coleta e análise de solo

Para o desenvolvimento e validação do método analítico foram coletadas amostras de solo nas granjas selecionadas. As coletas foram realizadas em locais próximos aos barracões na profundidade de 0-10 e 10-20 cm, com ajuda de um trado. Após a amostragem, o solo foi colocado em um balde limpo, homogeneizado, identificado e 300 g foi enviado ao Laboratório Pirasolo - Laboratório Agrotécnico Piracicaba S/C Ltda para análises químicas (pH, matéria orgânica - MO, CTC, P, K, Ca e Mg) e física (textura do solo). A porção restante das amostras (aproximadamente 300 g) foi levada ao Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP) onde foram liofilizadas, peneiradas (1,7 mm), extraídas e analisadas por HPLC-DAD/UV.

3.2.2.2 Desenvolvimento da metodologia analítica para análise de NOR, ENR e CIP em cama de aviário e solo

Os reagentes e solventes utilizados foram metanol (MeOH) grau HPLC (Tedia®), ácido fórmico grau analítico (Vetec®), nitrato de magnésio $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ (J.T. Baker®) e solução de amônia (25%) (Merck®). A água usada foi purificada através de um sistema de água Milli-Q (Millipore®). Os padrões analíticos de CIP 98,5% e ENR 99,0% foram adquiridos da Fluka Analytical® e de NOR 99,0% da Sigma Aldrich®.

Foram preparadas soluções-estoque de 100 µg mL^{-1} para cada analito (NOR, ENR e CIP) em MeOH. Todas as soluções foram estocadas em freezer a -20°C.

Condições cromatográficas

Equipamento: HPLC 1200 da Agilent®, equipado com bomba quaternária, injetor automático, degaseificador e detector de arranjo de diodos/ultravioleta (DAD/UV).

Coluna: Eclipse - XDB – C18 (4,6 X 150 mm, com partícula de 5 µm).

Comprimento de onda: 280 nm

Fase móvel: A - água ultrapura com 0,1% de ácido fórmico e B - MeOH.

Gradiente: 5% de B por 5 minutos e, a seguir, gradiente linear de 5% até 95% de B durante 40 min, com pós-time de 7 min.

Vazão: 1,0 mL min^{-1}

Volume de injeção: 50 µL

Temperatura da Coluna: 35ºC

Níveis de fortificação para cama de aviário: 2 mg kg^{-1} e 10 mg kg^{-1}
Níveis de fortificação para solo: 40 µg kg^{-1} e 80 µg kg^{-1}

Para a separação das FQs foi injetado uma solução com os produtos NOR, ENR e CIP na concentração de 3,0 mg L^{-1} em HPLC-DAD/UV (Figura 3.3).

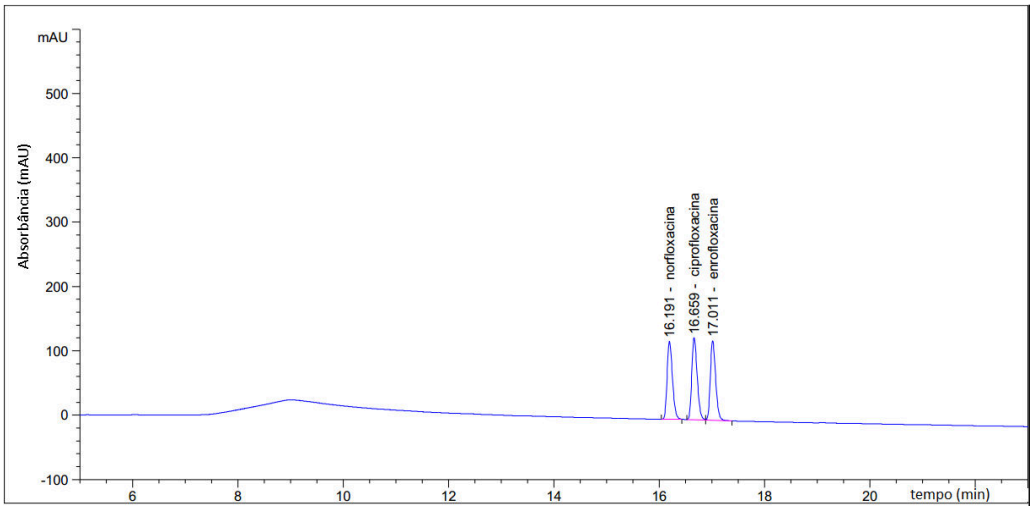


Figura 3.3 - Cromatograma da separação das FQs (NOR, CIP e ENR) na concentração 3,0 mg L^{-1}.

Método de extração de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em cama de aviário e solo

O método de extração considerado mais eficaz, com melhor recuperação dos analitos, foi o desenvolvido por Turiel et al. (2006), adaptado para as matrizes cama de aviário e solo.

A. <u>Método de extração em cama de aviário:</u>

Pesou-se 1 g de cama de aviário em tubos de Teflon® (50 mL) e adicionou-se 8 mL de solução de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ (70% m/v) com pH ~ 8,1, ajustado com uma solução de amônia 5%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min e, em seguida levadas para mesa agitadora horizontal protegida da luz por 7 min. Depois as amostras foram levadas para banho de ultrassom por 30 min, centrifugadas por 10 min a 10000 rpm e 1 mL do sobrenadante foi transferido para tubos de eppendorf de 2,5 mL contendo 0,2 g de C18. Homogeneizou-se novamente em vórtex por 30 s e centrifugou-se por 2 min a 5000 rpm. Depois desses procedimentos, o sobrenadante foi filtrado diretamente em *vials* através de filtro PVDF (difluoreto de polivinilideno) (0,45 µm) e analisados por HPLC-DAD/UV nas condições pré estabelecidas.

B. Método de extração em solo:

Pesou-se 2,5g de solo em tubos de Teflon® (50 mL) e adicionou-se 6 mL de solução aquosa de $Mg(NO_3)_2.6H_2O$ (70% m/v) com pH ~ 8,1, ajustado com uma solução de amônia 5% (v/v). As amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 min e levadas para uma mesa agitadora horizontal protegida da luz por 7 min. Em seguida, os extratos foram colocados em banho de ultrassom por 30 min e centrifugados por 10 min à 10000 rpm. Após estes procedimentos, o sobrenadante foi filtrado diretamente em *vials* através de filtro PVDF (0,45 µm) e analisados por HPLC-DAD/UV nas condições pré estabelecidas.

3.2.2.3 Validação da metodologia analítica para análise de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em cama de aviário e solo por HPLC-DAD/UV

Para assegurar a confiabilidade do método foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão.

Seletividade

A seletividade do método foi verificada com injeções dos extratos de cama de aviário e de solo "branco" (sem adição de antimicrobianos). As amostras de cama de aviário e de solo não apresentaram interferentes superiores a 30% do limite de quantificação nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados, o que torna o método seletivo (Figuras 3.4 e 3.5).

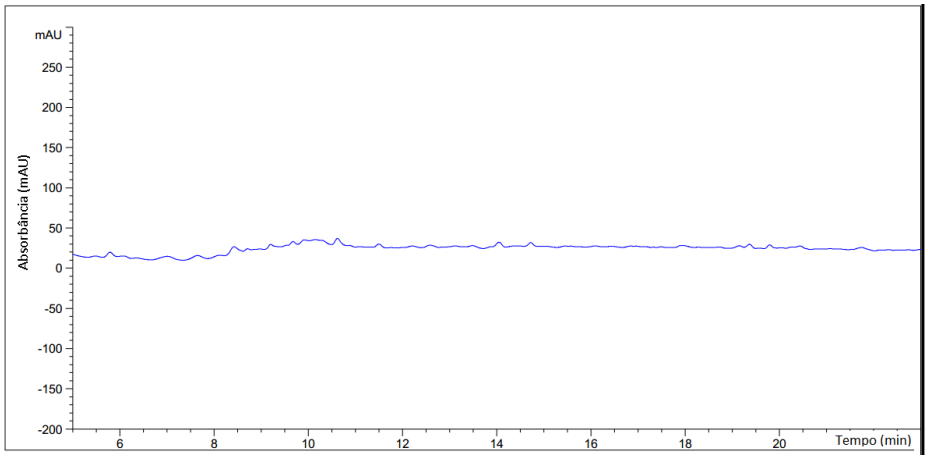


Figura 3.4 – Cromatograma da testemunha de cama de aviário (cama de aviário orgânica) (controle).

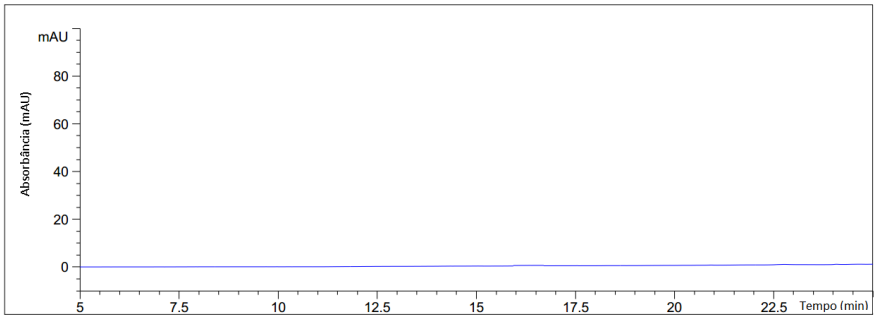


Figura 3.5 - Cromatograma da testemunha de solo (controle).

Linearidade e faixa de trabalho

Faixa de trabalho para cama de aviário: para a construção da curva analítica, a solução contendo os fármacos foi diluída e injetada, em quintuplicata, nas seguintes concentrações: 0,15; 0,50; 1,00; 1,50; 3,00; 5,00 e 7,00 mg L^{-1}.

Faixa de trabalho para solo: para a construção da curva analítica, a solução contendo os fármacos foi diluída e injetada, em quintuplicata, nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,10; 0,50 e 1,00 mg L^{-1}.

Os tempos de retenção dos compostos foram NOR: 16,19 min, CIP: 16,66 min e ENR: 17,01 min. A linearidade foi expressa pelos valores dos coeficientes de correlação, os quais estiveram dentro do valor considerado adequado (r^2 >0,99) (Tabelas 3.1 e 3.2).

Tabela 3.1 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r^2) para as FQs estudadas em cama de aviário.

ANTIMICROBIANO	EQUAÇÃO DA RETA	r^2
Norfloxacina	y = 296,4x – 20,63	0,999
Enrofloxacina	y = 300,51x – 26,31	0,999
Ciprofloxacina	y = 312,13x – 16,76	0,999

Tabela 3.2 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r^2) para as FQs estudadas em solos.

ANTIMICROBIANO	EQUAÇÃO DA RETA	r^2
Norfloxacina	y = 171,25x – 1,1469	0,999
Enrofloxacina	y = 146,77x – 2,8327	0,998
Ciprofloxacina	y = 182,858x – 1,5089	0,999

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados individualmente para cada analito utilizando o recurso do equipamento que permite o cálculo da relação entre a resposta do equipamento para o analito e o ruído obtido nas mesmas condições (sinal-ruído). O limite de detecção (LD) foi 3 vezes superior ao ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) 10 vezes este valor. Esses parâmetros foram calculados utilizando a menor concentração individual dos fármacos: 0,01 mg L^{-1} (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para as moléculas de interesse.

ANTIMICROBIANO	LD	LQ
	----------µg L^{-1}----------	
Norfloxacina	1,26	4,20
Enrofloxacina	1,12	3,73
Ciprofloxacina	2,52	8,40

Recuperação e precisão

Os ensaios de recuperação e precisão foram realizados utilizando cama de aviário orgânica e solo, ambos isentos de antimicrobianos (testemunhas). Foram realizados estudos de recuperação em 2 níveis (2 e 10 mg kg^{-1} para cama de aviário; 40 e 80 µg kg^{-1} para solo) com cinco replicatas. Os valores das médias das recuperações devem estar na faixa de 70 - 120% (baseado na RDC n.4, de 18 de janeiro de 2012) (ANVISA, 2012).

As precisões foram avaliadas em termos de repetitividade (intra-dia) dos resultados e precisão intermediária (inter-dia). As precisões foram medidas através do coeficiente de variação (CV%) entre as repetições (Tabelas 3.4 e 3.5) e devem apresentar valores até 20%.

Tabela 3.4 - Valores de recuperação e precisão (CV%) (n=5) para os analitos, na matriz cama de aviário.

Produto	Níveis Fortificação	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
	(mg kg^{-1})	----------intra-dia----------		----------inter-dia----------	
NOR	2	108	8,60	108	9,33
	10	80	10,41	75	9,78
ENR	2	88	4,13	71	6,28
	10	74	10,06	74	10,77
CIP	2	72	14,08	80	8,80
	10	74	7,08	97	10,51

Tabela 3.5 - Valores de recuperação e precisão (CV%) (n=5) para os analitos, na matriz solo.

Produto	Níveis Fortificação	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
	(µg kg^{-1})	----------intra-dia----------		----------inter-dia----------	
NOR	40	109	5,86	109	8,06
	80	110	2,05	118	4,22
ENR	40	99	5,36	95	9,95
	80	102	3,99	120	5,88
CIP	40	112	10,42	119	7,89
	80	114	4,78	120	2,71

3.2.2.4 Análise estatística

As coletas de cama de aviário foram realizadas dentro dos barracões de produção de frango de corte e as coletas de solo foram realizadas próximas a esses barracões, ambas ao acaso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO; 2009).

3.2.3 Avaliação da atividade microbiana em amostras de solo através da técnica de radiorespirometria

Coleta de solo

Foram realizados testes de transformação de carbono ("*Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test*") (baseado na OECD, 2000) para avaliar a atividade microbiana em amostras de solo contaminadas com NOR, ENR e CIP. O experimento foi conduzido no Laboratório Ecotoxicologia (CENA/USP). Foram utilizados dois tipos de solo: argiloso e arenoso com o objetivo de comparar os efeitos dos antimicrobianos em texturas contrastantes de solo. As amostras foram coletadas na camada de 0-10 cm de profundidade em regiões distantes da produção agrícola, garantindo a ausência de antimicrobianos pré-existentes ao experimento, confirmados por análises cromatográficas (HPLC-DAD/UV).

As amostras de solo foram secas ao ar, peneiradas (1,7 mm) e armazenadas em temperatura ambiente em sacos plásticos devidamente identificados. Em seguida, foram analisadas pelo Departamento de Solos da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) quanto às características físicas e químicas.

Antes do início dos estudos foram determinados a umidade, capacidade de campo, quantidade de solo a ser pesada e o volume de água a ser adicionado. O condicionamento das amostras foi realizado em frascos de 5 L (Figura 3.6), os quais foram mantidos em sala escura, climatizada a 20ºC (± 2ºC).

Figura 3.6 - Frasco de 5L hermeticamente fechado para condução de experimento de radiorespirometria.

3.2.3.1 Determinação da umidade nas amostras de solo (U)

Três placas de Petri (m_p) foram pesadas e 10 g de solo úmido foram adicionados. Em seguida, as placas foram novamente pesadas e observou-se a massa total (placa + solo úmido = $m_p + m$). Após este procedimento, as placas foram levadas para a estufa, a 105 (± 1ºC) por 24 h e depois deste período foram retiradas e colocadas em dessecador até seu resfriamento, em seguida foram novamente pesadas obtendo-se o valor da placa + solo seco ($m_p + m_s$).

A umidade das amostras de solo (U) foi calculada pela diferença entre os pesos das amostras úmidas e secas (OECD, 2000) (Equação 3.1):

$$U = (m_p + m) - (m_p + m_s) / (m_p + m_s) - (m_p) \qquad (3.1)$$

onde:

m_p = massa placa Petri;

m_p+m = massa placa Petri + massa do solo úmido;

m_p+m_s = massa placa Petri + massa do solo seco.

3.2.3.2 Determinação da capacidade de campo (CC)

A capacidade de campo foi determinada pela técnica denominada torrão separado pela frente de molhamento (TSFM), descrita por Costa (1983). O solo seco foi peneirado até

completar volume de 500 mL e, em seguida, gotejou-se 2 mL de água destilada durante 10 segundos sobre o solo e retirou-se o torrão úmido com ajuda de pinça curva, colocando-o em placas de Petri (placa de Petri pesada sem terra = m_p; placa pesada com o torrão úmido = m_p + m). As análises foram realizadas em triplicata. Depois de pesadas, as placas contendo o torrão úmido foram levadas à estufa a 60 (± 1ºC), por 24 h.

Após este período, as placas contendo o torrão de solo seco foram pesadas novamente (m_p + m_s) e a capacidade de campo foi calculada pela diferença entre os pesos das amostras úmidas e secas (Equação 3.2):

$$CC(\%) = \frac{(mp + m) - (mp + ms)}{(mp + ms) - (mp)} \cdot 100 \qquad (3.2)$$

onde:

m_p = massa placa Petri;

m_p+m = massa placa Petri + massa do torrão úmido;

m_p+m_s = massa placa Petri + massa do torrão seco.

3.2.3.3 Determinação da quantidade de solo a ser pesado

Nos experimentos de atividade microbiana foram utilizados 300 g de solo seco (OECD, 2000). Para determinar o peso real do solo úmido (equivalente a 300 g de solo seco) utilizou-se a equação 3.3:

$$m = (1 + U) \cdot m_s \qquad (3.3)$$

onde:

m = massa de solo úmido a ser pesado (g)

m_s = massa de solo seco desejado (300 g)

U = umidade do solo

3.2.3.4 Determinação do volume de água a ser adicionado nos frascos

Para iniciar os experimentos, é necessário que as amostras de solo atinjam 75% da capacidade de campo, portanto foi necessária a adição de água ao solo. Para determinar a quantidade de água a ser adicionada ao solo utilizou-se o cálculo abaixo (Equação 3.4):

$$V_a = [\left(\frac{CC.0,75}{100}\right) - U] \cdot m_s \qquad (3.4)$$

onde:

V_a = volume de água a ser adicionado ao solo (mL)

CC = capacidade de campo (%)

U = umidade do solo

m_s = massa de solo seco (g)

3.2.3.5 Montagem dos experimentos

Cada frasco de 5 L foi preparado com 300 g de solo seco. O volume de água foi ajustado para 75% da capacidade de campo (Tabela 3.6). Em seguida, os frascos foram pré-incubados no escuro por um período de dez dias com temperatura de 20 (±2ºC).

Tabela 3.6 - Teor de umidade, capacidade de campo, massa de solo e volume de água adicionado aos frascos de 5 L utilizados para conduzir os estudos com os antimicrobianos NOR, ENR e CIP, em duas classes de solo.

SOLOS	Teor de Umidade (U)*	Capacidade de campo (CC)* (%)	Massa de solo (m)* (g)	Volume de água (V_a)* mL
Arenoso	0,056	16,16	316,87	19,50
Argiloso	0,215	32,92	364,42	9,66

*Média de três repetições

Após esse período foram aplicados os tratamentos com os antimicrobianos (NOR, ENR e CIP): controle (sem aplicação de FQs), limite máximo tolerável de antimicrobianos em solo (100 µg kg^{-1}) e quatro vezes o limite máximo tolerável (400 µg kg^{-1}).

As amostras de solo foram homogeneizadas com ajuda de uma espátula logo após a aplicação das doses dos antimicrobianos (100 e 400 µg kg^{-1}). Em seguida, alíquotas de 10 g de solo foram retiradas dos frascos de 5 L e transferidas para frascos biométricos (Figura 3.7). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 3.7 - Frasco biométrico.

Uma alíquota de 1 mL de solução de glicose radiomarcada ^{14}C-Glicose (D-[U-^{14}C] Glicose) mais glicose padrão analítico, com atividade específica de 11 GBq mmol^{-1} e atividade total de 37 MBq mC^{-1} foi adicionada às amostras de solo de cada frasco biométrico aos 0, 7, 14 e 28 dias após a aplicação dos antimicrobianos.

Após a aplicação da glicose radiomarcada cada frasco biométrico foi fechado com tampa de borracha acoplada a um filtro de "soda lime", não havendo mais troca de gases com o ambiente, garantindo que o CO_2 presente na solução de NaOH fosse proveniente apenas da respiração dos microrganismos contidos nas amostras de solo. Uma alíquota de 10 mL de solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,2 mol L^{-1} foi adicionada na alça de cada frasco. Depois de 12 horas de incubação no escuro, coletou-se 1 mL do NaOH previamente adicionado à alça do frasco biométrico e misturou-se com 10 mL de solução cintiladora em vials de cintilação. As coletas de NaOH foram realizadas em duplicata. No final do dia os vials foram lidos em espectrômetro de cintilação líquida e os resultados forneceram os valores da taxa $^{14}CO_2$ evoluído, que é a quantidade de $^{14}CO_2$ liberado da glicose após sua mineralização. Todo procedimento foi repetido 7, 14 e 28 dias após o início do experimento. Foram realizadas checagens periódicas da quantidade de água nos frascos de 5 L contendo as amostras de solo, garantindo o valor inicial da umidade dos solos.

3.2.3.6 Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com aplicação de 2 doses (100 e 400 µg kg^{-1}) dos antimicrobianos (NOR, ENR e CIP), além do controle, para ambos os solos. Os valores de mineralização foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO; 2009).

3.2.4 Quantificação e caracterização da comunidade bacteriana do solo pelas técnicas de *q*PCR e PCR/DGGE

3.2.4.1 Coleta de solo

As coletas de solo foram realizadas nas granjas selecionadas logo após a chuva, garantindo a atividade microbiana nos locais. Foram coletadas 10 amostras de solo em duas situações distintas: local adjacente ao barracão (presença de FQs) e local sem aplicação de cama de aviário (ausência de FQs).

As amostragens dos solos foram realizadas com auxílio de uma pá de jardinagem na profundidade de 0-5 cm (zona de maior atividade microbiana), em diversos pontos e levadas ao Laboratório do Departamento de Ciência do Solo (ESALQ/USP) para extração do DNA total do solo, amplificação com *primers* específicos para o grupo das bactérias e análise. Frações destas amostras foram encaminhadas para as análises físico-químicas no mesmo Departamento.

A) Quantificação da comunidade bacteriana do solo

Análise de PCR em tempo real (*q*PCR) do gene 16S rRNA

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) quantitativa (*q*PCR) foi realizada com o uso do Step One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®) e as reações de amplificação com Syber® Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems®). Os *primers* usados foram 341F 1 (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') e 534R 2 (5'-ATTACCGCGGCTGCTTGG-3'), com concentração final de 100 nM.

As reações foram realizadas em triplicata, com um volume final de 25 µL para cada amostra. Foi utilizado 1 µL de DNA molde em cada reação de amplificação e as mesmas foram realizadas em placas MicroAmp Optical 48-Well. Foram utilizados dois controles negativos (ausência de DNA), os quais foram submetidos às mesmas condições das amostras de solo, excluindo qualquer possível contaminação externa.

As amostras de solo foram submetidas à amplificação com o seguinte ciclo: desnaturação inicial de 3 min a 95º C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94º C, 30 s a 55º C mais 30 s a 72º C e uma extensão final de 45 s a 72º C (MOSONI et al., 2007).

Curvas padrões conhecidas foram utilizadas em diluições seriadas (10^{-2} a 10^{-8}) em todas as reações, possibilitando que os dados obtidos nas amostras de solo (valor Ct) fossem

interpolados entre os valores das curvas, determinando o número de cópias do gene 16S por grama de solo.

B) Caracterização da comunidade bacteriana do solo

DGGE: Protocolo de extração de DNA em amostras de solo

A extração de amostras de DNA do solo foi realizada segundo o protocolo de Muyzer et al. (1993), adaptado por Andreote (2007). Na técnica de PCR-DGGE o DNA extraído diretamente do solo é utilizado para amplificação e posterior separação dos *amplicons* em gel de gradiente desnaturante. Desta maneira, a extração do DNA total presente em 0,5 g de solo é realizada utilizando o kit *Powersoil total DNA extraction* (MoBio, Carlsbad, EUA®) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Em seguida, verifica-se a quantidade do DNA extraído em gel de agarose 1% (p/v). Para este estudo, a amplificação do fragmento da região V6 do gene 16S DNAr foi realizada com os *primers* R1387 e U968-GC. O ciclo usado para amplificação foi: desnaturação inicial de 4 min a 94º C, seguida de 35 ciclos de 30 s a 94º C, 1 min a 63º C mais 1 min a 72º C e uma extensão final de 10 min a 72º C. Os produtos da PCR foram avaliados em gel de agarose 1,0%.

O produto foi inserido em um gel de poliacrilamida com gradiente desnaturante (45-65%) de bandas G-C% para descrição da estrutura da comunidade bacteriana nos tratamentos obtidos (com e sem aplicação de antimicrobianos), pela técnica de PCR-DGGE. A análise em DGGE foi realizada no aparelho *phorU system* (Ingeny®) com gradiente variando de 45 a 65% de desnaturação. O gel foi submetido a eletroforese por 16 h a 60º C. Após a eletroforese, o gel foi corado com *SYBR Green* I e fotodocumentado em luz ultravioleta.

Os perfis de DGGE obtidos foram analisados e comparados pelo programa *GelCompar*, no qual esses foram alinhados de acordo com um padrão externo, permitindo a análise conjunta de diferentes amostras (Figura 3.8).

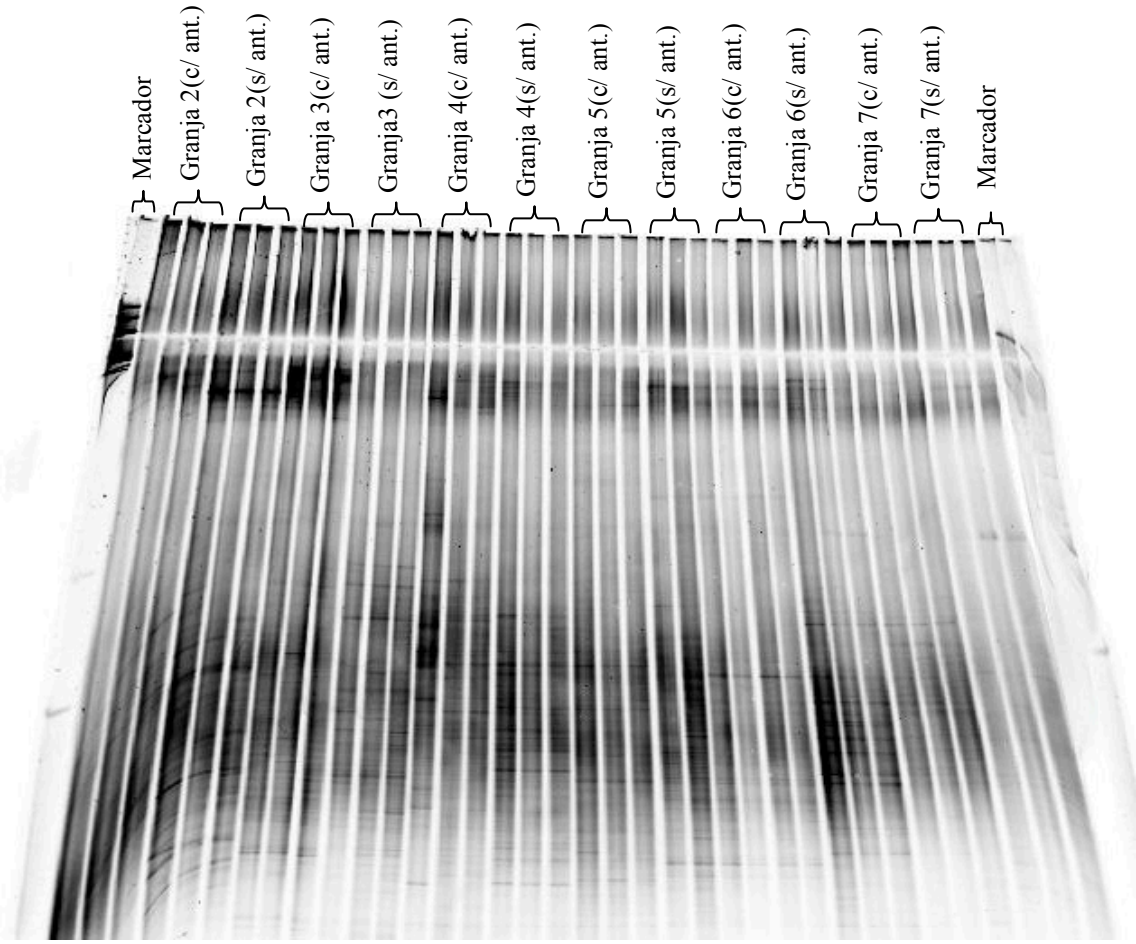


Figura 3.8 - Gel de DGGE das amostras de solo.

3.2.4.2 Análise estatística

As coletas foram realizadas ao acaso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO; 2009).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Determinação de FQs em cama de aviário

A) Acúmulo de NOR, ENR e CIP em cama de aviário: comparativo entre granjas

A importância dos estudos de fármacos veterinários em cama de aviário deve-se ao seu uso na adubação orgânica, uma vez que os antimicrobianos presentes têm potencial de contaminação dos solos onde são aplicados. Vários estudos mostraram evidências de efeitos ecotoxicológicos de antimicrobianos sobre os microrganismos do solo (FERNANDEZ et al., 2004; MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007).

Neste estudo foi observado que a cama de aviário apresentou quantidade notável de nutrientes, principalmente N, P e K (Tabela 3.7), justificando o seu uso como adubo orgânico em lavouras. No entanto, a presença de antimicrobianos nesse produto tem sido negligenciada, mesmo dentre os produtores orgânicos. Muitos estudos foram realizados para entender o comportamento de FQs em solo, água e sua relação com desenvolvimento de resistência em microrganismos, mas poucos trabalhos relatam a presença desses fármacos em cama de aviário.

Tabela 3.7 - Análise química das amostras de cama de aviário.

PRODUTOR	Nitrogênio	Fósforo	Potássio	Cálcio	Magnésio	Enxofre
	----------g kg^{-1}----------					
Granja 1	32,20	13,25	27,50	22,00	4,33	8,25
Granja 2	36,40	12,00	19,25	19,00	4,03	9,25
Granja 3	28,70	9,50	16,00	17,25	4,33	7,75
Granja 4	30,10	13,00	19,25	22,50	4,95	9,75
Granja 5	35,00	13,50	19,25	25,75	5,68	11,50
Granja 6	24,50	10,25	14,50	25,00	4,75	7,75
Testemunha (cama de aviário orgânica)	33,60	13,75	19,25	17,50	5,80	6,00

Foram observadas altas concentrações dos antimicrobianos NOR, ENR e CIP nas amostras de cama de aviário nas seis granjas selecionadas, independente da granjada ou número de frangos presentes nos galpões (Tabela 3.8). Ressalta-se que a CIP não é um produto aplicado diretamente na produção animal, mas sua presença nas amostras deve-se a degradação da ENR, composto mais utilizado na produção de frango de corte na região estudada.

Tabela 3.8 - Produtor, número aproximado de frangos, granjada e concentração média (n=3) de antimicrobianos encontrados em cama de aviário.

Produtor	Nº aproximado de frangos	Momento da coleta (granjada)	NOR	CIP	ENR
			----------mg kg^{-1}----------		
Cama de aviário orgânica	*	3	nd	nd	nd
Granja 1	49000	2	1,53 ±0,05	1,48 ±0,07	1,92 ±0,08
Granja 2	37500	3	4,72 ±0,48	1,76 ±0,14	1,97 ±0,05
Granja 3	25000	1	7,89 ±0,17	2,43 ±0,12	1,55 ±0,05
Granja 4	26000	2	1,75 ±0,04	1,20 ±0,01	2,37 ±0,16
Granja 5	49000	3	2,43 ±0,18	2,07 ±0,02	4,59 ±0,01
Granja 6	13000	1	1,78 ±0,06	2,43 ±0,23	8,31 ±0,36

*dado não informado

Além das excretas dos animais contendo antimicrobianos parcialmente metabolizados, outra possível explicação para as altas concentrações de FQs encontradas nas amostras pode estar relacionada com a forma de manejo da água, uma vez que esses antimicrobianos são administrados pela água de consumo dos frangos. Ao final de cada dia, os bebedouros são lavados e a sobra de água contendo FQs é eliminada diretamente no piso da granja ou nos solos adjacentes, ocasionando concentração de fármacos. Neste experimento foi possível observar que o acúmulo de FQs não está relacionado com as bases (cátions) contidas neste substrato. O provável motivo que gerou a concentração de NOR na granja 3 (7,89 mg kg^{-1}) e de ENR na granja 6 (8,31 mg kg^{-1}) logo na primeira granjada, segundo informações dos produtores, foi um lote de frangos debilitados. Assim que os animais chegaram aos galpões receberam doses elevadas de agentes antimicrobianos como medida curativa e não profilática.

Alguns estudos foram realizados para determinar a ocorrência de FQs em cama de aviário e os valores obtidos variaram entre 5,3 µg kg^{-1} e 1,4 g kg^{-1} (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007; KARCI; BALCIOGLU, 2009; HU et al., 2010, ZHAO et al., 2010; ZHOU et al., 2013). Em trabalho realizado na França em 2009, observou-se concentrações elevadas de ENR e CIP em cama de aviário, variando entre 9,7 e 16,6 mg kg^{-1} para ENR e 1,0 e 2,2 mg kg^{-1} para o CIP (POURCHER et al., 2014). Esses autores relataram que houve distribuição desigual de FQs entre as áreas amostradas, assim como ocorreu no presente estudo, onde algumas granjas apresentam concentrações mais elevadas de fármacos do que outras, provavelmente devido à forma de manejo desse substrato dentro dos galpões, quantidade de fármacos aplicados, tipo de distribuidor de água, entre outros.

Ainda na tabela 3.8, observou-se que os resultados de ENR e NOR foram elevados, mas, mesmo assim, menores do que os resultados encontrados na França (2009) que chegaram até 22 mg kg^{-1} de ENR em cama de aviário (MORARU et al., 2012).

De forma análoga a este estudo, outros autores observaram que as concentrações de CIP não sofrem grandes variações, independente das concentrações de ENR encontradas (BOUND; VOULVOULIS, 2004; PHILLIPS et al., 2004; KARCI; BALCIOGLU, 2009; XIE et al., 2012). Para Karci e Balcioglu (2009), nenhum resíduo de CIP foi encontrado em amostras de cama de aviário na região de Mármara/Turquia. No entanto, foram detectados baixos níveis de ENR (0,06 mg kg^{-1}), resultando em concentrações de CIP abaixo do limite de detecção. Altas concentrações de fármacos veterinários encontrados no ambiente devem-se ao aumento significativo da quantidade de ração necessária para alimentar animais como suínos, aves e gado e, consequentemente, adição de quantidades consideráveis de antimicrobianos nessas rações (PHILLIPS et al., 2004), cerca de 30-90% desses fármacos são liberados no ambiente através de esterco (BOUND; VOULVOULIS, 2004; XIE et al., 2012).

Há uma preocupação mundial com a contaminação ambiental por FQs, pois esses compostos são frequentemente detectados. Muitas vezes encontram-se duas ou mais moléculas do mesmo grupo em amostras ambientais (ZHAO et al., 2010). Foram encontrados níveis muito elevados de ENR, CIP e NOR em amostras de cama de aviário coletadas em províncias da China (2007): 1420,76 mg kg^{-1}, 45,59 mg kg^{-1} e 225,45 mg kg^{-1} para ENR, CIP e NOR, respectivamente (ZHAO et al., 2010). Devido à alta quantidade de amostras positivas para ENR e CIP em estudos realizados pelo mundo, suspeita-se que essas moléculas acumulem em solos agrícolas (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007).

B) Acúmulo de NOR, ENR e CIP em cama de aviário durante um período de produção.

A cama de aviário é um substrato reutilizado durante várias granjadas dentro do barracão de produção e a sua substituição fica a critério do produtor.

Neste estudo, investigou-se a relação entre o tempo de uso da cama de aviário e o acúmulo de FQs. Observou-se que houve acúmulo de NOR, CIP e ENR de acordo com o tempo de produção do barracão (nº de granjadas) (Tabela 3.9).

Tabela 3.9 - Acúmulo de NOR, CIP e ENR em amostras de cama de aviário.

Tempo (dias)	NOR	CIP	ENR
	----------mg kg^{-1}----------		
0	0 d	0 c	0 d
45	1,78 ±0,06 c	1,95 ±0,17 b	4,35 ±0,18 c
90	2,89 ±0,08 b	2,32 ±0,04 ab	6,08 ±0,08 b
135	4,64 ±0,14 a	2,43 ±0,23 a	8,31 ±0,36 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Este acúmulo deve-se às novas doses de antimicrobianos que são aplicadas toda vez que uma nova granjada é introduzida no barracão de produção. Desta forma, o maior acúmulo foi constatado para ENR no 135° dia (8,31 mg kg^{-1}). Observou-se que a concentração de CIP em cama de aviário estabilizou após 45 dias (1ª granjada), apesar do acúmulo de ENR continuar ocorrendo. Este fato pode ser explicado, provavelmente, devido a degradação da ENR ser lenta, uma vez que esses barracões não recebem luz solar diretamente sobre a cama de aviário, dificultando a fotodegradação dessas moléculas (RODRIGUES-SILVA et al., 2014).

Alguns produtores retiram todo o substrato do barracão a cada nova granjada e os expõe à luz solar por dois ou três dias antes de reutilizarem a cama de aviário. Esta prática visa reduzir a umidade e proliferação de larvas no substrato, que causam altos índices de mortalidade em frangos novos. Esta ação simples também acelera a fotodegradação das FQs contidas na camada da cama exposta à luz solar, diminuindo a contaminação ambiental (BARTOSKOVA et al., 2014). No entanto, outros produtores só removem a cama de aviário do barracão no momento da venda do produto para ser utilizado como fertilizante orgânico, fato que pode ocorrer logo após a 1ª granjada (dependendo do preço ofertado pela cama) ou depois da 6ª granjada (aproximadamente 270 dias de uso do substrato). No caso da granja em questão, esse substrato só foi removido no momento da venda (3ª granjada), justificando o acúmulo de fármacos com o tempo.

3.3.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em solos de granjas de produção de frango de corte

Trabalhos recentes demonstraram a persistência de fármacos veterinários em solos (LI et al., 2013; POURCHER et al., 2014; VAN DOORSLAER et al., 2014). Assim, são necessárias medidas efetivas para atenuar a poluição causada pelo uso dos antimicrobianos no ambiente. No entanto, a maioria dos estudos destaca a remoção desses produtos somente em corpos d'água e a contaminação em solos acaba sendo desprezada (DONG et al., 2009; LIU et

al., 2009; SUN et al., 2009; ELMOLLA; CHAUDHURI, 2010; JEONG et al., 2010;. RODRIGUEZ et al., 2012; VERLICCHI et al., 2012; LI et al., 2013).

Foi detectada a presença de NOR, ENR e CIP nos solos de cinco granjas estudadas (Tabelas 3.10, 3.11 e 3.12). Apesar das várias recomendações de limites em alimentos, até o momento não foram estabelecidas legislações que determinem os limites máximos para concentração de FQs em solos. Por este motivo, utiliza-se um limite genérico de 100 µg kg^{-1} determinado pela Agência Européia para a Avaliação de Produtos Medicinais (2001) (*European Agency for the Evaluation of Medical Products*) para fármacos veterinários em solo (PEREIRA et al., 2012). De acordo com essa orientação técnica, não é necessária avaliação de risco para substâncias com um nível de exposição abaixo de 100 µg kg^{-1} para o solo (MONFORT, 2005). Assim, a concentração de ENR mostrou-se acima do tolerável na Granja 2 (Tabela 3.11), indicando provável contaminação ambiental. Também foi encontrada alta concentração de CIP nesta propriedade (Tabela 3.12), o que é procedente, já que trata-se de um metabólito da ENR. É importante lembrar que a aplicação de CIP na produção pecuária é proibida, pois se trata de um medicamento de uso humano.

Muitos estudos detectaram concentrações de FQs em campo acima dos valores encontrados neste estudo, como é o caso da Província de Shandong, a maior área de produção hortícola da China. Neste caso foram encontrados em solos cultiváveis valores entre 0,1 - 166,9 µg kg^{-1} para ENR, 2,4 - 651,6 µg kg^{-1} para CIP e 0,4 - 288,3 µg kg^{-1} para NOR (LI, et al., 2013).

Tabela 3.10 - Concentração de NOR em solos das granjas em duas profundidades distintas.

NOR	**G 1**	**G 2**	**G 3**	**G 4**	**G 5**	**G 6**
	----------µg kg^{-1}----------					
0-10 cm	<LD	63,2 ±8,4 a	24,1 ±2,4 b	<LD	11,9 ±2,2	15,1 ±2,4
10-20 cm	<LD	25,1 ±5,3 b	56,5 ±5,6 a	<LD	<LD	<LD

As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey (p <0,05).
G = granja

Tabela 3.11 - Concentração de ENR em solos das granjas em duas profundidades distintas.

ENR	**G 1**	**G 2**	**G 3**	**G 4**	**G 5**	**G 6**
	----------µg kg^{-1}----------					
0-10 cm	<LD	325,0 ±12 a	56,4±9,8 a	28,8 ±5,9 a	32,3±4,7	14,1 ±0,5
10-20 cm	<LD	92,3 ±12 b	33,3 ±5,7 b	28,8 ±4,9 a	<LD	<LD

As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey (p <0,05).
G = granja

Tabela 3.12 - Concentração de CIP em solos das granjas em duas profundidades distintas.

CIP	G 1	G 2	G 3	G 4	G 5	G 6
	----------μg kg^{-1}----------					
0-10 cm	<LD	85,6 ±4,6 a	34,2 ±6,0	<LD	<LD	19,0 ±0,4
10-20 cm	<LD	34,9 ±4,2 b	<LD	10,2 ±3,7	<LD	<LD

As médias seguidas por letras diferentes na coluna diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).
G = granja

Em cama de aviário, as maiores concentrações de FQs foram observadas nas granjas 3 e 6. Essas propriedades contam com o mesmo tipo de bebedouro, em que há o descarte da água contendo fármacos no final do dia, esse fato pode ter causado a concentração de ENR e NOR diretamente na palhada (cama de aviário). Todavia, em solo, observou-se a maior concentração de NOR, ENR e CIP nas granjas 2 e 3.

A forma de manejo da cama de aviário dentro da granja interfere na concentração de fármacos encontrados em solo (POURCHER et al., 2014). Um estudo realizado na França (2009) demonstrou que a aplicação ou manipulação de cama de aviário apresenta potencial de contaminação dos solos. Assim, os pesquisadores analisaram os solos antes que o adubo fosse aplicado e, após a aplicação, encontraram níveis entre 13 e 518 μg kg^{-1} de ENR. Depois de 48 dias da aplicação do adubo este composto ainda estava presente nas amostras de solo, evidenciando sua persistência. Para CIP, os valores encontrados variaram entre 13 e 30 μg kg^{-1} (POURCHER et al., 2014).

Alguns estudos evidenciaram longo tempo de permanência de FQs em solos (GOLET et al., 2002; GOTTSCHALL et al., 2012; VAN DOORSLAER et al., 2014), chegando a atingir tempo de meia-vida de mais de 580 dias (ROSENDAHL et al., 2011). Outros estudos identificaram a persistência de FQs em solos entre 4 semanas e 7 meses após a adubação com cama de aviário (MARTINEZ-CARBALLO et al., 2007; KARCI, BALCIOGLU, 2009). Alguns pesquisadores justificam a escolha de FQs para experimentos devido ao seu longo tempo de permanência em solo (> 6 meses após a aplicação) (BOXALL et al., 2003). Os longos períodos de meia-vida indicam a natureza persistente das FQs em matrizes de solo (VAN DOORSLAER et al., 2014). Foram observadas concentrações médias de 300 e 400 μg kg^{-1} de NOR e CIP, respectivamente, 13 meses após a aplicação de cama de aviário em solos isentos de FQs em campos experimentais em Zürich/Suíça (GOLET et al., 2002). Também foram observadas baixas taxas de lixiviação desses compostos em solos adubados com cama de aviário em Ottawa/Canadá (2009). Além disso, um ano após a aplicação, 60-70% das FQs ainda estavam presentes, adsorvidas ao solo (GOTTSCHALL et al., 2012).

Neste estudo não foi possível verificar a persistência das FQs no solo (tempo de meia vida), pois os produtores utilizam as mesmas moléculas há anos, sendo que a reaplicação em frangos e/ou lavagem dos barracões contendo sobras de fármacos acontece várias vezes durante o ano e os solos adjacentes aos barracões sofrem recontaminação.

Embora pouco relatado em literatura, observou-se que a aplicação direta de cama de aviário em campos agrícolas causou maior acúmulo de FQs do que a irrigação destes com efluentes secundários (VAN DOORSLAER et al, 2014). Foram encontrados valores de FQs que variaram entre 600 ng kg^{-1} e 9,8 mg kg^{-1} para solos que receberam adubação com cama de aviário e até 10 µg kg^{-1} para solos que foram irrigados com efluentes contendo esses fármacos. Esses dados evidenciaram que a poluição é muito maior quando a cama de aviário contaminada entra em contato direto com os solos. No entanto, estudos de campo ainda são escassos, a maior parte dos pesquisadores delimita uma área experimental, aplicam cama de aviário ou efluente e observam o comportamento desses compostos no tempo (GOLET et al., 2002; GOTTSCHALL et al., 2012).

Conforme observado, a produção de frango de corte (número de frangos ano^{-1}) e a contaminação dos solos apresentou relação apenas para a Granja 2, indicando que o número de animais presentes nos barracões não é fator determinante para o acúmulo de FQs no solo (Tabela 3.13). A forma de tratar as aves, evitando aplicação de fármacos em excesso; a forma de limpeza dos bebedouros que acumulam fármacos ao longo do dia e são lavados sobre a própria cama de aviário e o manejo desse substrato são fatores que estão diretamente ligados à contaminação do ambiente.

Tabela 3.13 - Tempo de uso do galpão e número de frangos ano^{-1}.

Granja	**Tempo de atividade (anos)**	**Cabeça ano^{-1}**
1	18	380.000
2	8	500.000
3	31	150.000
4	10	250.000
5	12	120.000
6	20	350.000

Apesar das formas de contaminação de solos serem diversas (aplicação de cama de aviário em campo, irrigação com efluentes, manipulação mal executada destes produtos dentro das granjas etc), o fator determinante para o acúmulo de FQs está relacionado com a composição física e química do solo. O comportamento dos antimicrobianos (disponibilidade

e persistência) é regulado pelo ambiente, sendo mais relevantes a sorção, a transformação (degradação) e a lixiviação, que estão relacionados às propriedades do solo (teor de MO, textura, mineralogia, CTC, pH etc.) (DRILLIA et al., 2005; SARMAH et al., 2006; KEMPER, 2008). Tais processos são orientados conforme as propriedades físico-químicas inerentes ao respectivo antimicrobiano, tais como: estrutura molecular, tamanho, forma, solubilidade e hidrofobicidade (SARMAH et al., 2006; REGITANO, PEREIRA LEAL, 2010). Os resultados das análises físico-químicas dos solos estão apresentados nas Tabelas 3.14 e 3.15.

Tabela 3.14 - Análises químicas dos solos.

PRODUTOR	pH $CaCl_2$	MO g dm^{-3}	P resina mg dm^{-3}	K	Ca	Mg	Soma bases	CTC
				----------	----------	mmol$_c$ dm^{-3}	----------	----------
Granja 1	5,0	12	142	21,7	53	28	102,7	122,9
Granja 2	6,3	27	633	8,3	426	354	788,3	797,0
Granja 3	6,3	47	1848	40,9	208	101	349,9	364,6
Granja 4	6,4	16	283	7,9	130	82	219,9	231,8
Granja 5	5,3	8	12	3,2	44	27	74,2	90,6
Granja 6	6,4	23	136	3,6	33	21	57,3	68,0

Observou-se que as granjas 2 e 3, que apresentaram maior acúmulo de fármacos (Tabelas 3.10, 3.11 e 3.12), também apresentam valores mais elevados de CTC e MO (Tabela 3.14). As moléculas de FQs, por apresentarem cargas positivas, formam complexos estáveis com as cargas negativas do solo, (CARRASQUILLO et al., 2008; VASUDEVAN et al., 2009; FIGUEROA-DIVA et al., 2010; WANG, et al., 2011) o que pode ter gerado uma forte capacidade de adsorção destas moléculas e maior acúmulo destes fármacos.

A CTC e a textura do solo são os fatores com maior influência sobre a adsorção de FQs (VASUDEVAN et al., 2009; FIGUEROA-DIVA et al., 2010). Quanto maior a CTC, maior a persistência e acúmulo de NOR, ENR e CIP (WANG, et al., 2011). Esses autores concluíram que a troca iônica foi o principal mecanismo de adsorção de CIP em solos argilosos. Entretanto, outros estudos afirmaram que a MO é o fator mais importante relacionado à sorção de FQs em solos (THIELE, 2000; PEREIRA et al., 2012), pois esta pode proporcionar locais prontamente acessíveis para as moléculas dos antimicrobianos presentes nos solos (PU; CUTRIGHT, 2006). No entanto, alguns pesquisadores discordam, alegando que solos sem MO apresentam mais sítios de sorção e que a MO poderia ocultar esses sítios e bloquear o acesso dos fármacos aos mesmos (PILS, LAIRD, 2007; ZHANG et al., 2009).

Além dos atributos químicos do solo sua textura contribui com o potencial de sorção de FQs, ou seja, quanto mais cargas negativas os solos possuírem, maior será a adsorção dos fármacos e, quanto mais argiloso, maior é a quantidade de cargas, causando o acúmulo desses antimicrobianos no solo (NOWARA et al., 1997; VASUDEVAN et al., 2009; FIGUEROA-DIVA et al., 2010; SPELTINI et al., 2011; PEREIRA LEAL et al., 2013). Foi possível observar que o solo com maior teor de argila foi da granja 3 (Tabela 3.15), mas os atributos químicos do solo, principalmente a CTC e MO, foram os fatores que mais interferiram e causaram o acúmulo de NOR, ENR e CIP nas amostras analisadas.

Tabela 3.15 - Análises físicas dos solos.

PRODUTOR	Argila <0,002mm	Silte 0,05-0,002mm	Areia Total 2,00-0,05mm
	---------- g kg^{-1} ----------		
Granja 1	175	331	494
Granja 2	200	97	702
Granja 3	446	141	413
Granja 4	199	54	747
Granja 5	100	47	854
Granja 6	300	175	525

Alguns trabalhos discutem a relação da adsorção de FQs e textura do solo (NOWARA et al., 1997; TOLLS, 2001; GU, KARTHIKEYAN, 2005; VASUDEVAN et al., 2009; PEREIRA LEAL et al., 2013). Tolls (2001) verificou que a sorção de ENR é crescente quanto mais carga o solo possuir. Já na França foi verificado que a mobilidade da CIP está intimamente ligada à MO dissolvida, aos minerais do solo, a CTC elevada (100-150 cmol kg^{-1}) e ao pH (7,1) (MOUGIN et al., 2013). Estas propriedades garantem forte adsorção da CIP aos minerais (VASUDEVAN et al., 2009; WU et al., 2010). Na China houve adsorção de CIP em solos com pH elevado, acima de 7,0 (valores próximos ao pKa_2), ocorrendo formação de complexos desta molécula com os íons do solo (Zn, Al, Fe, Ni, Mg) (GU, KARTHIKEYAN, 2005; DREVENŠEK et al., 2006; WU et al., 2010). Entretanto, esta não é uma realidade comum no Brasil, especialmente no Estado de São Paulo, que apresenta solos mais ácidos, intemperizados e a MO apresenta uma grande importância na CTC. Portanto, os solos com maior concentração de FQs foram aqueles que apresentaram maior CTC.

Há estudos que relacionam o pH do solo e a concentração de FQs (VASUDEVAN et al., 2009), uma vez que esses compostos são moléculas anfóteras, com dois grupos funcionais ionizáveis (diferentes valores de pKa) e, dependendo do pH do solo, apresentam-se na forma catiônica ou aniônica (GU, KARTHIKEYAN, 2005; PICÓ; ANDRÉU, 2007), alterando sua capacidade de adsorção.

Neste estudo, não foi possível traçar uma relação entre acúmulo de FQs e pH, uma vez que o último não apresentou variações significativas entre as amostras, estando próximo ou abaixo do pKa_1 (pKa~6). Portanto houve prevalência das formas catiônicas das FQs, aumentando a capacidade de sorção em solos com valores mais elevados de CTC (Tabela 3.14). Só é possível estabelecer uma correlação entre valores de pH e sorção de FQs em experimentos que analisem ampla faixa de pH em solos, permitindo estudos desses compostos tanto na sua forma catiônica quanto aniônica (VASUDEVAN et al., 2009; CONKLE' et al., 2010).

3.3.3 Atividade microbiana: Radiorespirometria

Avaliou-se a evolução do $^{14}CO_2$ oriundo da mineralização da ^{14}C-glicose em duas doses de FQs aplicadas (100 e 400 µg kg^{-1}) em solos arenoso e argiloso. Foi observado que a presença das FQs nos solos não afetou a atividade microbiana, não interferindo na mineralização (28 dias) (Tabelas 3.16, 3.17 e 3.18).

Tabela 3.16 - Médias do $^{14}CO_2$ evoluído (%) em relação ao total de radioatividade aplicada nos tratamentos com NOR.

SOLOS	Trat. (µg kg^{-1})	Dia de coleta 0	7	14	28
		----------% radioatividade aplicada----------			
ARENOSO	Controle	23,66 ±1,36 aA	21,67 ±0,40 abA	20,11 ±0,24 bA	16,63 ±1,11 cA
ARGILOSO		23,68 ±2,24 aA	21,42 ±0,21 abA	20,58 ±0,43 bA	19,75 ±0,15 bA
ARENOSO	100	25,90 ±0,98 aA	22,36 ±0,37 bA	23,52 ±0,49 aA	14,50 ±1,12 bA
	400	25,41 ±0,98 aA	22,94 ±0,94 aA	22,61 ±2,08 a A	14,74 ±0,77 b A
ARGILOSO	100	23,02 ±3,87 aA	20,37 ±0,67 abA	20,59 ±0,68 abA	18,08 ±1,00 bA
	400	21,14 ±3,32 aA	21,18 ±0,87 aA	20,12 ±1,53 aA	19,00 ±0,60 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$). Trat. = tratamento.

Tabela 3.17 - Médias do $^{14}CO_2$ evoluído (%) em relação ao total de radioatividade aplicada nos tratamentos com ENR.

SOLOS	Trat. (µg kg^{-1})	Dia de coleta 0	7	14	28
		----------% radioatividade aplicada----------			
ARENOSO	Controle	23,66 ±1,36 aA	21,67 ±0,40 abA	20,11 ±0,24 bA	16,63 ±1,11 cA
ARGILOSO		23,68 ±2,24 aA	21,42 ±0,21 abA	20,58 ±0,43 bA	19,75 ±0,15 bA
ARENOSO	100	21,15 ±0,26 aA	22,85 ±1,79 aA	22,25 ±0,67 aA	17,97 ±0,43 bA
	400	22,52 ±0,17 aA	22,66 ±0,71 a A	18,82 ±1,67 bA	16,07 ±0,91 cA
ARGILOSO	100	20,55 ±0,21 aA	20,93 ±0,51 aA	18,56 ±0,26 bA	17,89 ±1,26 bA
	400	23,61 ±1,12 aA	21,41 ±0,25 bA	22,39 ±0,31 abA	22,55 ±0,54 abA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey (p <0,05). Trat. = tratamento.

Tabela 3.18 - Médias do $^{14}CO_2$ evoluído (%) em relação ao total de radioatividade aplicada nos tratamentos com CIP.

SOLOS	Trat. (µg kg^{-1})	Dia de coleta 0	7	14	28
		----------% radioatividade aplicada----------			
ARENOSO	Controle	23,66 ±1,36 aA	21,67 ±0,40 abA	20,11 ±0,24 bA	16,63 ±1,11 cA
ARGILOSO		23,68 ±2,24 aA	21,42 ±0,21 abA	20,58 ±0,43 bA	19,75 ±0,15 bA
ARENOSO	100	22,80 ±0,16 aA	22,15 ±0,53 abA	21,29 ±0,51 bA	14,66 ±0,79 cA
	400	24,16 ±2,69 aA	23,48 ±1,16 aA	23,82 ±2,21 aA	15,50 ±1,68 bA
ARGILOSO	100	21,56 ±3,26 aA	20,85 ±0,58 aA	19,51 ±2,89 abA	17,63 ±3,56 bA
	400	22,08 ±1,63 aA	21,75 ±1,41 aA	20,58 ±0,81 aA	20,14 ±0,64 aA

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e maiúscula na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey (p <0,05). Trat. = tratamento.

Considerando os tratamentos com 100 e 400 µg kg^{-1} de FQs, para NOR a taxa de mineralização foi de 11,4% e 10,7%, para solo arenoso e 4,94% e 2,14% para solo argiloso. Para a ENR, a taxa de mineralização foi de 3,2% e 6,5% para solo arenoso e 3,3% e 1,06% para solo argiloso. E finalmente, para a CIP, 8,14% e 8,66% para solo arenoso e 3,9% e 1,9% para solo argiloso. Também foram observados queda na taxa de mineralização nos controles de 7,03% o e 3,93% para os solos arenoso e argiloso, respectivamente.

Esses resultados indicariam uma queda da atividade microbiana em todos os tratamentos ao longo dos 28 dias de incubação. No entanto, essa queda também foi observada

nas amostras "controle" (sem adição dos fármacos), comprovando que não houve efeitos deletérios nas atividades dos microrganismos do solo como efeito da adição de NOR, ENR e CIP.

Estudos realizados na França registraram valores abaixo de 0,01% de mineralização de CIP, mesmo após 84 dias de incubação (MOUGIN et al., 2013). Esses autores afirmaram que apesar dos possíveis mecanismos de degradação de FQs, o tempo de meia-vida em amostras de solo foram até 200 vezes maiores que em sedimentos. Tempos de meia-vida entre 1 e 3 anos para CIP e NOR, respectivamente, foram relatados em solos, revelando alta resistência à degradação por fatores bióticos e abióticos (WALTERS et al., 2010).

A CIP pode facilmente acumular no solo (MOUGIN et al., 2013). Repetidas aplicações de antimicrobianos na forma de fertilizante orgânico na agricultura são superiores as suas taxas de degradação, causando o acúmulo desses compostos nas camadas do solo (KEMPER, 2008). No atual experimento verificou-se que ambos os solos apresentam comportamento parecido em relação à atividade microbiana até o 14º dia, mas no 28º dia a taxa de mineralização reduziu drasticamente no solo arenoso, mesmo para o tratamento controle. Essa queda abrupta na mineralização da ^{14}C-glicose não foi evidenciada para o solo argiloso. Como os tratamentos controle apresentaram o mesmo padrão de resposta que os solos tratados com NOR, ENR e CIP, pode-se afirmar que essa diferença observada entre os solos arenoso e argiloso na coleta do dia 28 são inerentes às propriedades dos solos e não aos tratamentos com fármacos.

Em solos arenosos, que possuem menor quantidade de cargas, os fármacos ficam disponíveis na solução do solo e ficam à disposição da ação de microrganismos, enquanto em solos argilosos essas moléculas sofrem sorção devido às cargas negativas e ficam indisponíveis para biodegradação. Como pode ser observado, o solo argiloso (Tabela 3.19) apresentou maior quantidade de MO e CTC (Tabela 3.20) e esses parâmetros influenciam na sorção de FQs no ambiente terrestre. Para alguns autores, a forte adsorção de FQs em solos é governada pela quantidade de MO, pelos minerais do solo e pelo pH (embora não comprovado neste estudo), quanto mais cargas o solo apresenta, maior será a sorção das FQs e menor a mineralização (THIELE-BRUHN, 2003; TURIEL et al., 2006; LOURENCETTI et al., 2007; STURINI et al., 2010).

Tabela 3.19 - Atributos físicos dos solos utilizados no experimento de atividade microbiana.

SOLOS	Argila <0,002mm	Silte 0,053-0,02mm	Areia total 0,210-2,00mm
	----------g kg^{-1}----------		
Arenoso	109	8	883
Argiloso	455	185	360

Tabela 3.20 - Atributos químicos dos solos utilizados no experimento de atividade microbiana.

SOLOS	pH ($CaCl_2$)	MO	P (resina)	K	Ca	Mg	Soma bases	CTC
		g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------$mmol_c$ dm^{-3}----------				
Arenoso	4,8	2	2	0,3	8	4	12	46
Argiloso	4,9	11	7	1,3	18	6	25	59

A baixa disponibilidade de CIP para os microrganismos do solo acarreta baixa mineralização microbiana em condições aeróbicas. Este composto pode estabilizar como resíduo e causar impacto ecotoxicológico à microbiota do solo (MOUGIN et al., 2013). Corroborando com essa afirmação, pesquisadores relataram inibição da respiração do solo e mudança na abundância e diversidade de comunidades microbianas após a aplicação de CIP (GIRARDI et al., 2011). No entanto, essas alterações só foram verificadas em condições de contaminação elevada do solo. Em condições reais de contaminação de solos da França por dejetos suínos contendo CIP não foi observado qualquer efeito negativo sobre a comunidade microbiana (IGEL-EGALON et al., 2012).

Na Alemanha, pesquisadores não comprovaram correlação entre atividade de microrganismos, tratamento do solo e FQs (GIRARDI et al., 2011). Esses autores afirmaram que os baixos valores de mineralização na presença de FQs não pareciam estar relacionados a qualquer efeito tóxico desses fármacos sobre a microbiota do solo e que esses resultados indicam a baixa capacidade dos microrganismos em mineralizar FQs.

Uma observação importante é que, em condições de campo, quanto mais arenoso for o solo, maior será a lixiviação, assim as FQs acabam se movendo no solo causando pouca toxicidade aos microrganismos da superfície. No entanto, não houve estudo de lixiviação neste experimento, pois o ensaio foi realizado em laboratório utilizando frascos de vidro, com quantidade limitada e homogeneizada de solo.

Apesar de não serem encontrados efeitos deletérios na comunidade microbiana dos solos neste experimento, ainda assim faz-se necessário estudar a resistência aos

antimicrobianos e genes associados, pois há entrada constante de adubos orgânicos contendo FQs no ambiente e esses podem causar efeitos deletérios na comunidade bacteriana do solo (FINLEY et al., 2013) ou ainda promover a seleção de microrganismos resistentes. A maioria dos genes que codificam a resistência em patógenos humanos tem origem em bactérias do ambiente (por exemplo, o gene de resistência *qnr*).

A atividade humana tem causado a rápida evolução e disseminação de novos genes de resistência aos fármacos. É necessário reduzir a disseminação de bactérias ambientais resistentes que possam atingir pessoas/animais através de resíduos em alimentos e água (CHENG et al, 2012; FINLEY et al., 2013).

Medidas de controle para evitar o uso indiscriminado de antimicrobianos têm sido tomadas. A Organização Mundial da Sáude (OMS) estabeleceu uma lista de antimicrobianos "criticamente importantes" para os seres humanos para garantir prudência no uso de fármacos em medicina humana e veterinária (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012). As cefalosporinas de terceira e quarta geração, FQs e macrolídeos são considerados os medicamentos que necessitam de maior urgência na gestão de riscos de seu uso em animais destinados à alimentação (FINLEY et al., 2013).

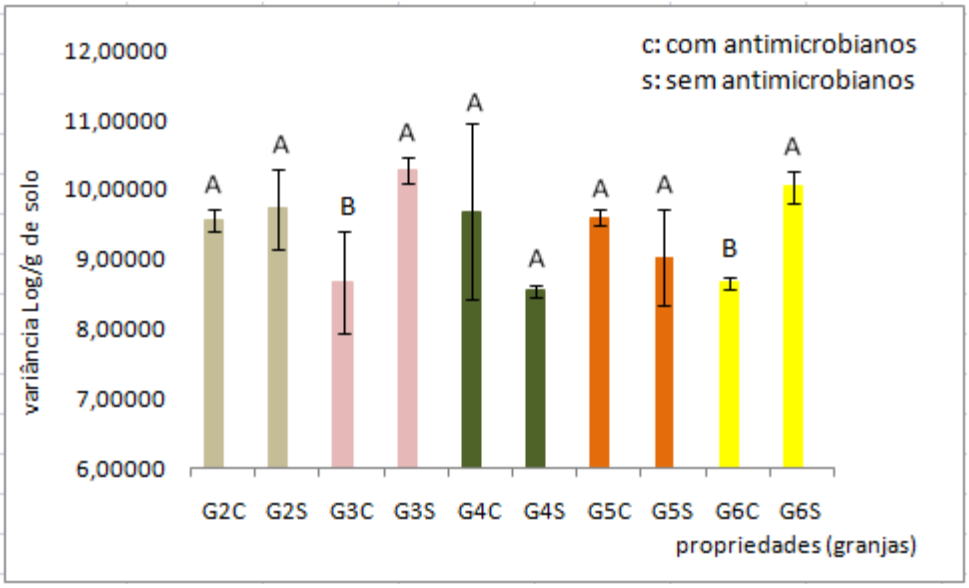
É importante salientar que experimentos que utilizam a técnica de radiorespirometria analisam a taxa de mineralização da ^{14}C-glicose, independente do grupo de microrganismos responsáveis por esse processo. Como o objetivo principal deste trabalho foi verificar se as FQs presentes no ambiente podem afetar a comunidade bacteriana dos solos, fez-se necessário estudos específicos da ação desses fármacos sobre a comunidade bacteriana do solo pelas técnicas de *q*PCR e DGGE/PCR, pois a técnica usada neste estudo não discriminou se a mineralização observada foi consequência da ação da comunidade fúngica ou bacteriana dos solos.

3.3.4 Abundância bacteriana: PCR quantitativo

A presença de microrganismos nos solos é muito importante em termos de fluxo energético da cadeia trófica, pois estes são os principais responsáveis pela mineralização dos compostos orgânicos, cerca de 90%, tornando os nutrientes disponíveis na solução do solo (LAVELLE, 2000). Por este motivo é essencial manter a estabilidade da comunidade de microrganismos dos solos, evitando medidas que causem efeitos deletérios na mesma.

Como pode ser observado nas granjas 3 e 6 (Figura 3.9), houve redução no número de bactérias presentes nos solos contaminados com FQs. Como a cama de aviário é colocada diretamente no solo sem nenhum tratamento prévio, as altas concentrações de NOR e ENR

devem ter causado efeitos deletérios na comunidade bacteriana nessas duas propriedades. Todas as granjas deste estudo aplicam há anos ENR ou NOR nos frangos em doses terapêuticas ou curativas, dependendo do estado de saúde dos animais. As granjas estudadas têm de 8 à 31 anos de atividade e produzem de 70.000 à 500.000 frangos ano^{-1} (Tabela 3.13). Esses dados evidenciam que os solos adjacentes aos galpões receberam, indiretamente, doses significativas e sucessivas de fármacos veterinários, causando os efeitos negativos observados.



Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey (p <0,05).

Figura 3.9 - Abundância da comunidade bacteriana em solos de granjas de frango de corte que receberam doses constantes de FQs (com antimicrobianos) e em solos que não receberam aplicações desses fármacos (sem antimicrobiano).

Os fatores que causaram a queda na quantidade de bactérias nos solos parece não estar relacionado com a persistência das FQs nesta matriz, uma vez que o maior acúmulo de fármacos ocorreu na Granja 2 (Tabelas 3.10, 3.11 e 3.12), como elucidado anteriormente. Também observou-se que as características físico-químicas dos solos não foram responsáveis pela diminuição na abundância bacteriana (Tabelas 3.21 e 3.22), pois os principais fatores que contribuem para aumento da persistência desses fármacos no ambiente são: MO e CTC (valores mais elevados encontram-se nas granjas 2 e 4). A explicação mais provável, neste caso, seriam as altas concentrações de NOR (7,89 mg kg^{-1}) e ENR (8,31 mg kg^{-1}) encontradas na cama de aviário das propriedades 3 e 6, respectivamente (Tabela 3.8).

Tabela 3.21 - Análises químicas dos solos.

GRANJA	pH $CaCl_2$	MO g dm^{-3}	P resina mg dm^{-3}	K	Ca	Mg	H+Al	Soma bases	CTC
				---------- $mmol_c$ dm^{-3} ----------					
G2 (c/ant)	6,4	23	633	8,3	426	354	9	788,3	797,0
G2 (s/ant)	5,4	47	107	7,8	55	43	25	106,3	131,1
G3 (c/ant)	5,8	29	96	4,2	51	22	38	77,0	115,0
G3 (s/ant)	6,4	18	29	4,6	48	17	18	69,3	87,5
G4 (c/ant)	6,4	47	1848	40,9	208	101	15	349,9	364,6
G4 (s/ant)	6,3	5	128	4,2	383	53	7	440,1	447,1
G5 (c/ant)	6,3	16	283	7,9	130	82	12	219,9	231,8
G5 (s/ant)	6,5	8	19	5,0	86	79	15	170,0	184,7
G6 (c/ant)	5,3	8	12	3,2	44	27	16	74,2	90,6
G6 (s/ant)	6,4	45	430	2,5	32	29	11	63,4	74,1

Tabela 3.22 - Análises físicas dos solos.

GRANJA	Argila <0,002mm	Silte 0,05-0,002mm	Areia Total 2,00-0,05mm
	----------g kg^{-1}----------		
G2 (c/ant)	200	97	702
G2 (s/ant)	247	104	650
G3 (c/ant)	600	265	130
G3 (s/ant)	446	183	371
G4 (c/ant)	446	141	413
G4 (s/ant)	184	95	722
G5 (c/ant)	199	54	747
G5 (s/ant)	298	222	480
G6 (c/ant)	100	47	854
G6 (s/ant)	100	27	873

É importante ressaltar que a coleta de solos para quantificação de células bacterianas por *q*PCR foi realizada na camada superficial (0-5cm) e a coleta de solo para análise de FQs por HPLC-DAD/UV foi realizada até os 10 cm. Este fator pode ter causado uma diluição de antimicrobianos no perfil do solo, por este motivo não foram observadas altas concentrações desses fármacos nos solos das granjas 3 e 6.

A técnica de *q*PCR não é indicada para estudos sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos, pois esta mostra apenas se houve declínio da abundância de células em determinada amostra (análise quantitativa). O estudo sobre a estrutura da comunidade bacteriana dos solos é importante para compreender a seleção de determinadas espécies ou a

indução de resistência em outras (análise qualitativa) e a técnica de PCR/DGGE é a mais indicada.

Segundo Zilli et al., (2003), a redução da diversidade microbiana no solo pode indicar a perda de resiliência e, consequentemente, da qualidade do solo. A abundância de algumas espécies de microrganismos pode não ser tão importante quanto a manutenção da diversidade, isso porque a abundância reflete de forma mais imediata a flutuação microbiana de curto prazo e a diversidade revela o equilíbrio entre os diversos organismos e os domínios funcionais no solo (KENNEDY, 1999; LAVELLE, 2000; ZILLI et al., 2003).

Em trabalhos realizados concomitantemente em Barcelona/Espanha e na Tunísia, entre os anos de 2011 e 2014, foram verificados vários genes bacterianos resistentes a antimicrobianos usados tanto para animais quanto para humanos (COLOMER-LLUCH et al., 2014). Os autores já haviam identificado alguns genes resistentes em água residual em Barcelona, entre eles *ecA*, *qnrA* e *qnrS.* Após um ano realizaram novos estudos e relataram que os genes mais abundantes nos dois países foram o *sul1*, seguido pelo bla_{TEM}. Esses genes foram encontrados em mais de 80% das amostras, entre elas a *Escherichia coli* isolada de carne de frango (SOUFI et al., 2011) e a *Enterobacteriaceae*, isolada em um hospital universitário (DAHMEN et al., 2010a; DAHMEN et al., 2010b; COLOMER-LLUCH et al., 2014).

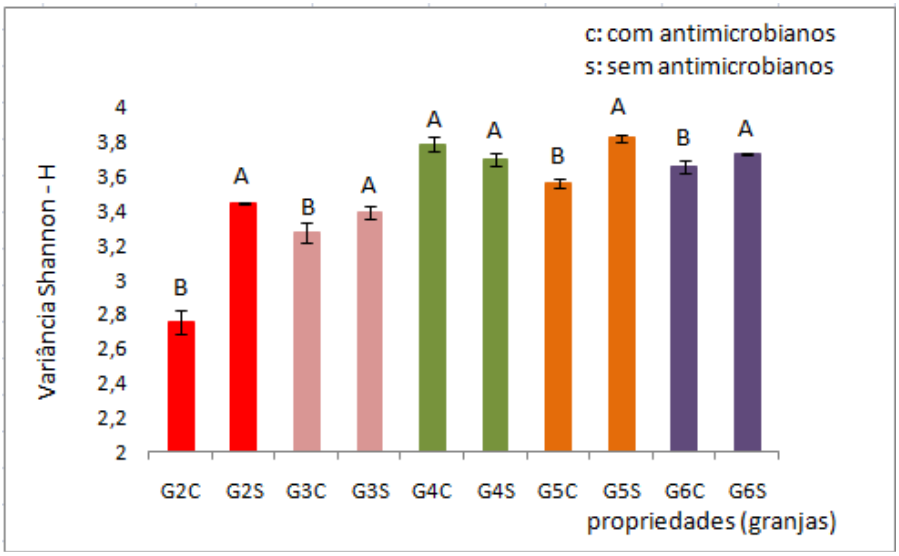
Outros autores demonstraram que a presença de 200 $\mu g\ kg^{-1}$ de CIP em solos franceses por longo tempo afetaram a composição e a atividade microbiana dessa matriz (GIRARDI et al., 2011). O fato torna-se ainda mais preocupante quando considerado que a CIP é um medicamento de uso humano e uma possível resistência bacteriana no ambiente pode atingir cursos d'água potável ou alimentos afetando animais e seres humanos (FINLEY et al., 2013). Além disso, a elevada estabilidade das FQs no ambiente pode selecionar microrganismos resistentes (CHEN et al., 1997). Assim, é necessário entender o comportamento dos fármacos veterinários em diversas matrizes, entre elas o solo (VASUDEVAN et al., 2009).

Na China (2013) foram detectados mais de 12 genes resistentes à diversos fármacos (JIA et al., 2014). Esses genes foram encontrados em águas residuais de suinocultura e em rios adjacentes às granjas. Trabalhos anteriores já haviam relatado a presença desses genes em águas residuais, em rios impactados por ações antrópicas (TAO et al, 2010; STORTEBOOM et al, 2010) e em águas superficiais em lagoas, rios e estações de tratamento de esgoto (STOLL et al., 2012). A pecuária é considerada uma fonte importante de indução de resistência bacteriana, principalmente a criação de gado (JIA et al., 2014) que utiliza grande quantidade de fármacos veterinários. O principal problema é que esses genes resistentes a

antimicrobianos podem afetar a qualidade dos solos, das águas de rios e lagos adjacentes às fazendas que, muitas vezes, são usados como fonte de água potável por moradores locais.

3.3.5 Estrutura da comunidade bacteriana em solos: PCR/DGGE

Com exceção da granja 4, todas as demais apresentaram declínio na estrutura da comunidade bacteriana dos solos contaminados com FQs (NOR, ENR e CIP) (Figura 3.10).



Médias seguidas pela mesma letra, na mesma propriedade, não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Figura 3.10 - Número médio de bandas encontrado em amostras de solos de granjas de frango de corte que receberam doses constantes de FQs (com antimicrobianos) e em solos que não receberam aplicações desses fármacos (sem antimicrobiano).

Não houve relação entre as propriedades físico-químicas dos solos e a modificação da estrutura da comunidade bacteriana nas granjas estudadas, pois os valores de CTC, MO e o teor de argila/areia variaram entre as granjas (Tabelas 3.21 e 3.22). Não foram constatadas alterações na comunidade bacteriana do solo entre os tratamentos (presença e ausência de FQs) na granja 4, mas esta propriedade apresentou níveis elevados de CTC e teor de argila, o que sugeriria acúmulo de FQs no solo devido ao seu potencial de sorção afetando negativamente as espécies bacterianas presentes nesta matriz. Já na granja 5 não era esperado declínio na população bacteriana, pois esta apresentou níveis mais baixos de CTC e teor de argila, sugerindo baixa persistência das FQs e lixiviação no solo. No entanto, a relação entre os parâmetros físicos e químicos dos solos, a presença de FQs e a estrutura da comunidade bacteriana não foram observados neste experimento.

O fator que melhor se relacionou com a estrutura da comunidade bacteriana neste estudo foi a presença de FQs em cama de aviário. Como relatado anteriormente, foram observadas concentrações elevadas de FQs neste substrato nas granjas 2 (4,72 mg kg^{-1} de NOR), 3 (7,89 mg kg^{-1} de NOR), 5 (4,59 mg kg^{-1} de ENR) e 6 (8,31 mg kg^{-1} de ENR), as mesmas propriedades que apresentaram efeito negativo na microbiota do solo na presença desses compostos. A aplicação desse substrato provavelmente alterou a comunidade bacteriana da camada superficial do solo.

No entanto, sabe-se que a dinâmica dos microrganismos em solos dependem de diversos outros fatores como condições climáticas, por exemplo, e relacionar a atividade microbiana apenas aos atributos físico-químicos do solo seria uma visão muito simplista da dinâmica dos microrganismos, solos e contaminação. Assim para se estudar o efeito de um determinado atributo físico-químico do solo nesta população bacteriana sob efeito de uma FQ seria necessário realizar experimentos em condições controladas.

Não se deve afastar a possibilidade da redução na diversidade microbiana ter sido algum efeito pontual, uma vez que a coleta das amostras foi realizada uma única vez. Foi discutido que houve acúmulo de FQs em cama de aviário em algumas propriedades devido a forma incorreta de descarte da água contendo fármaco dos bebedouros e em outras devido a chegada de um lote de frangos debilitados, resultando na administração de uma quantidade elevada de antimicrobiano durante a granjada. Assim, os efeitos negativos causados à microbiota do solo nessas granjas pode estar relacionado a maior presença de FQs em cama de aviário durante o período da coleta das amostras, não sendo um fato usual.

De forma geral, o padrão de resposta quanto à diversidade microbiana no ecossistema é que a diversidade funcional em uma área impactada inicialmente é baixa. Com o tempo, a população de microrganismos se restabelece e entra em equilíbrio, mantendo-se estável (LAVELLE, 2000; TORSVIK; OVREÅS, 2002; ZILLI et al., 2003).

Um dos problemas da exposição prolongada aos antimicrobianos é a seleção de determinados grupos de bactérias, os quais nem sempre apresentam utilidade agronômica. A situação fica crítica quando as espécies resistentes começam a se proliferar em excesso, sobrepondo as de interesse agronômico. Além disso, as espécies resistentes podem transferir os genes resistentes a outros grupos de bactérias (BOXALL et al., 2003). Uma vez que uma estirpe patogênica tenha sofrido mutação para se tornar resistente a uma molécula específica de antimicrobiano, ela pode transferir o seu material genético para outras bactérias, mesmo que essas não sejam espécies estreitamente relacionadas entre si (AMABILE-CUEVAS, 2003).

O maior problema das espécies microbianas que surgem após um estresse/perturbação ambiental é o fato de que nem sempre as novas espécies apresentam a mesma taxa de crescimento ou a mesma capacidade competitiva dos microrganismos originais, mesmo que desempenhem a mesma função (PETTERSON, BAATH, 2003). Além disso, os novos indivíduos podem não executar suas funções com a mesma eficiência que os indivíduos originais, não gerarem os mesmos metabólicos ou influenciar a atividade de outras populações na comunidade (RIAH-ANGLET, et al., 2015).

Estudos como o de Collignon et al. (2009) relacionaram antimicrobianos e a presença de genes resistentes no ambiente e no homem, sugerindo que a maioria de *Escherichia coli* resistentes a fármacos presentes no ser humano podem ser oriundos da pecuária, principalmente da produção avícola. No sul da China (2008) foram identificadas inibições de 21 e 19,6% no crescimento de *Trichorderma koningii* e 37,5 e 25,8% no crescimento de *Fusarium moniliforme* em solos contaminados por CIP e ENR, respectivamente (ZHOU et al., 2008). Os mesmos autores comprovaram que concentrações até 15,7 $\mu g\ kg^{-1}$ de ENR e CIP no solo inibem o crescimento de bactérias patogênicas, mas acima deste valor o crescimento de bactérias benéficas para a produção agrícola também são inibidas. No presente estudo foram encontrados valores que variaram entre 11,92 a 325 $\mu g\ kg^{-1}$ de FQs em solos, sendo que a maioria dos resultados foram superiores aos relatados por Zhou et al., (2008), indicando provável efeito negativo no crescimento de bactérias benéficas ao solo.

Um experimento de campo realizado na França analisou 8600 frangos tratados com ENR e observou-se que a composição natural da população de *Escherichia coli* nessas áreas modificou drasticamente após a aplicação de cama de aviário contendo esse fármaco, conduzindo o aparecimento de um genótipo ERIC-PCR mais adaptado às novas condições impostas ao ambiente (POURCHER, et al., 2014). No entanto, outros estudos constataram que não houve resistência bacteriana em solos que receberam doses crescentes de CIP (até 20 $mg\ kg^{-1}$ por 65 dias), uma vez que a toxicidade de agentes antimicrobianos em solos diminui com o tempo, por causa da transformação de moléculas em compostos menos tóxicos e da própria adsorção ao solo, diminuindo a sua disponibilidade (GIRARDI et al., 2011).

Enfim, a utilização deste resíduo tem se mostrado viável em termos agronômicos e econômicos para as culturas, além de elevar os teores de N, carbono (ADELI et al., 2007), K, S (CARVALHO, 2011) e P no solo (MELLO; VITTI, 2002). Esta prática tem se consagrado entre os produtores, que não deixarão de aplicar a cama de aviário em suas propriedades devido ao risco de selecionarem cepas/genes de bactérias resistentes. Entretanto, sabendo-se que as FQs são fotossensíveis (PEREIRA et al., 2012), medidas paliativas no intuito de

reduzir a ação dos antimicrobianos no solo podem ser realizadas, como a exposição da cama de aviário à luz solar antes da aplicação em campo e a adoção de bebedouros modernos que diminui o desperdício de água e consequentemente a contaminação.

3.4 Conclusões

O uso regular de fluoroquinolonas (NOR, CIP e ENR) na produção avícola tem levado à contaminação do solo, acima dos limites toleráveis (> 100 $\mu g\ kg^{-1}$) e sugerem-se medidas de monitoramento e controle.

A presença destes fármacos não interferiu diretamente na mineralização da ^{14}C-glicose, mas afetou a abundância e a estrutura da comunidade bacteriana dos solos.

Referências

ADELI, A.; SISTANI, K.R.; ROWE, D.E.; TEWOLDE, H. Effects of broiler litter on soybean production and soil nitrogen and phosphorus concentrations. **Agronomy Journal,** Madison, v.97, p.314-321, Jan-Feb 2005.

ADELI, A.; SISTANI, K.R.; ROWE, D.E.; TEWOLDE, H. Effects of broiler litter applied to no-till and tillage cotton on selected soil properties. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v.71, p.974-983, May-Jun 2007.

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Gathering of resistence genes in gram-negative bactéria: an overview. In: AMÁBILE-CUEVAS, C.F. (Ed.). **Multiple drug resistant bacteria**. Wymondham, UK: Horizon Scientific Press, 2013.p. 9-31.

ANDREOTE, F.D. **Fatores determinantes na composição da comunidade bacteriana associada às plantas.** 2007. 201 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2007.

BARTOSKOVA, M.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; PANA, O.; ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P. Norfloxacin-toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters. **Biomed Research International**, New York, Mar 2014

BOATENG, S.A.; ZICKERMANN, J.; KORNAHRENS, M. Poultry manure effect on growth and yield of maize.**West African Journal of Applied Ecology**, Grahamstown, South Africa, v.9, p.1-11, Jan-Jun 2006.

BOUND, J.P.; VOULVOULIS N. Pharmaceuticals in the aquatic environment—a comparison of risk assessment strategies. **Chemosphere**, Oxford, v.56, p.1143-4455, Sep 2004.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SORENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science &Technology,** Easton, v.37, p.286-294, Aug 2003.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Exportação animal**: Aves. Brasília, DF. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/aves>. Acesso em: 18 fev. 2015.

CARRASQUILLO, A.J.; BRULAND, G.L.; MACKAY, A.A.; VASUDEVAN, D. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil materials: influence of compound structure. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, p. 7634-7642, Jul 2008.

CARVALHO, E.R.; REZENDE, P.M.; ANDRADE, M.J.B.; PASSOS, A.M.A.; OLIVEIRA, J.A. Fertilizante mineral e resíduo orgânico sobre características agronômicas da soja e nutrientes no solo**. Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v.42, n.4, p.930-939, Oct-Dez 2011.

CHEN, Y.; ROSAZZA, J.P.N.; REESE, C.P.; CHANG, H.Y.; NOWAKOWSKI, M.A.; KIPLINGER, J.P. Microbial models of soil metabolism: biotransformations of danofloxacin. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology,** Houndmills, v. 19, n. 5-6, p. 378-384, Nov-Dec 1997.

CHENG A.C.; TURNIDGE, J.; COLLIGNON, P. Control of fluoroquinolone resistance through successful regulation, Australia. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v.18, p.1453–1460, Sep 2012.

COLLIGNON, P.; POWERS, J.H.; CHILLER, T.M.; AIDARA-KANE, A. AARESTRUP, F.M. WHO Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies for the Use of Antimicrobials in Food Production Animals. **Clinical Infectious Diseases,** Chicago, v. 49, n. 1, p. 132-141, Jul 2009.

COLOMER-LLUCH, M.; CALERO-CACERES, W.; JEBRI, S.; HMAIED, F.; MUNIESA, M.; JOFRE, J.Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. **Environment International,** Elmsford, v. 73, p. 167-175, Dec 2014.

CONKLE, J.L.; LATTAO, C.; WHITE, J.R.; COOK, R. Competitive sorption and desorption behavior for three fluoroquinolone antibiotics in a wastewater treatment wetland soil. **Chemosphere,** Oxford, v. 80, n. 11, p. 1353-1359, Sep 2010.

COSTA, M.A. **Efeito da matéria orgânica em alguns atributos do solo.** 1983. 137 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1983.

DAHMEN, S.; MANSOUR, W.; BOUJAAFAR, N.; ARLET, G.; BOUALLEGUE, O. Distribution of cotrimoxazole resistance genes associated with class 1 integrons in clinical isolates of enterobacteriaceae in a university hospitalin Tunisia. **Microbial Drug Resistance,** Larchmont, v. 16, n. 1, p. 43-47, Mar 2010.

DAHMEN, S.; POIREL, L.; MANSOUR, W.; BOUALLEGUE, O.; NORDMANN, P. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae from Tunisia. **Clinical Microbiology and Infection,** Oxford, v. 16, n. 7, p. 1020-1023, Jul 2010.

DONG, J.; LI, Y.T.; ZHANG, L.J.; LIU, C.S.; ZHUANG, L.; SUN, L.N. The oxidative degradation of sulfadiazine at the interface of alpha-MnO_2 and water. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology,** Chichester Sussex, v.84, p.1848–1853, Dec 2009.

DREVENSEK, P.; KOSMRLJ, J.; GIESTER, G.; SKAUGE, T.; SLETTEN, E.; SEPCIC, K.; TUREL, I. X-ray crystallographic, NMR and antimicrobial activity studies of magnesium complexes of fluoroquinolones – racemic ofloxacin and its S-form, levofloxacin. **Journal of Inorganic Biochemistry**, New York, v. 100, p. 1755–1763, Jul 2006.

DRILLIA, P.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. Fate and mobility of pharmaceuticals in solid matrices. **Chemosphere,** Oxford, v. 60, n. 8, p. 1034-1044, Aug 2005.

ELMOLLA, E.S.; CHAUDHURI, M. Degradation of amoxicillin, ampicillin and cloxacillin antibiotics in aqueous solution by the UV/ZnO photocatalytic process. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v.173, p.445–449, Jan 2010.

FERNANDEZ, C.; ALONSO, C.; BABIN, M.M.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J.V. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.323, p.63-69, May 2004.

FIGUEROA-DIVA, R. A.; VASUDEVAN, D.; MACKAY, A. A. Trends in soil sorption coefficients within common antimicrobial families. **Chemosphere,** Oxford, v. 79, n. 8, p. 786-793, May 2010.

FINLEY, R.L.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D.G.J.; MCEWEN, S.A.; LI, X.Z.; GAZE, W.H. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases,** Chicago, v.57, p.704-710, Sep 2013.

GIRARDI, C.; GREVE, J.; LAMSHÖFT, M.; FETZR, I.; MILTNER, A.; SCHÄFFER, A.; KÄSTNER, M. Biodegradation of ciprofloxacin in water and soil and its effects on the microbial communities. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, n.198, p.22-30, Dec 2011.

GOLET, E.M.; STREHLER,A.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v.74, p.5455-5462, Nov 2002.

GOTTSCHALL, N.; TOPP, E.; METCALFE, C.; EDWARDS, M.; PAYNE, M.; KLEYWEGT, S.; RUSSELL, P.; LAPEN, D.R. Pharmaceutical and personal care products in groundwater, subsurface drainage, soil, and wheat grain, following a high single application of municipal biosolids to a field. **Chemosphere,** Oxford, v. 87, n. 2, p. 194-203, Apr 2012.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K. G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 39, n. 23, p. 9166-9173, Dec 2005.

HOFFMANN, I.; GERLING, D.; KYIOGWOM, U.S.; MANÉ-BIELFELDT, A. Farmers management strategies to maintain soil fertility in a remote area in northwest Nigeria. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v.86, n.3, p.263-275, Sep 2001.

HU, X. G.; ZHOU, Q. X.; LUO, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. **Environmental Pollution**, London, v.158, p.2992–2998, Sep 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Abate de animais, produção de couro, leite e ovos**: Tabelas: Animais abatidos e peso de carcaças. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201403_1.shtm>. Acesso em: 18 fev. 2015.

IGEL-EGALON, A.; CHEVIRON, N.; HEDDE, M.; HERNANDEZ-RAQUET, G.; MOUGIN, C. ISTA 14-Impact of antibiotics from pig slurry on soil microbial communities, including the basidiomycete *Trametes versicolor*. **Environmental Toxicology**, New York, v. 27, n. 3, p. 129-136, Mar 2012.

JEONG, J.; SONG, W.H.; COOPER, W.J.; JUNG, J.; GREAVES, J. Degradation of tetracycline antibiotics: mechanisms and kinetic studies for advanced oxidation/reduction processes. **Chemosphere,** Oxford, v. 78, p.533-540, Jan 2010.

JIA, S.Y.; HE, X.W.; BU, Y.Q.; SHI, P.; MIAO, Y.; ZHOU, H.P.; SHAN, Z.J.; ZHANG, X.X. Environmental fate of tetracycline resistance genes originating from swine feedlots in river water. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes,** London, v. 49, n. 8, p. 624-631, 2014.

KARCI, A.; BALCIOGLU., I.A, Investigation of the tetracycline, sulfonamide, and fluroquinolone antimicrobial compounds in animal manure and agricultural soils in Turkey. **Scienceof theTotal Environment,** Amsterdam, v. 407, p. 4652–4664, May 2009.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, New York, v. 8, p.1-13, Jan 2008.

KENNEDY, A.C. Bacterial diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v.74, p.65-76, Jun 1999.

LAVELLE, P. Ecological challenges for soil science. **Soil Science,** New Brunswick, v.165, p.73-86, Jan 2000.

LI, Y.X.; ZHANG, X.L.; LU, W.L.; BEI, L.X.F.; WANG, J. The residues and environmental risks of multiple veterina antibiotics in animal faeces. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 185, p. 2211-2220, Mar 2013.

LIU, C.S.; ZHANG, L.J.; LI, F.B.; WANG, Y.; GAO, Y.; LI, X.Z. Dependence of sulfadiazine oxidative degradation on physicochemical properties of manganese dioxides. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, DC, v.48, p. 10408–10413, Dec 2009.

LOURENCETTI, C.; FAVORETO, R.; MARCHI, M.R.R.; RIBEIRO, M.L. Residues of organochlorine pesticides and PCBs in some Brazilian municipal solid waste compost. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, London, v.42, p. 697-705, Aug 2007.

MARTINEZ-CARBALLO, E.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution,** London, v. 148, n. 2, p. 570-579, Jul 2007.

MELLO, S.; VITTI, G.C. Desenvolvimento do tomateiro e modificações nas propriedades químicas do solo em função da aplicação de resíduos orgânicos, sob cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, Brasília, DF, v. 20, n.2, p200-206, 2002.

MELO, L.C.A.; SILVA, C.A.; DIAS, B.O. Caracterização da matriz orgânica de resíduos de origens diversificadas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.32, n.1, p. 101-110, 2008.

MONFORT, E.; LOPEZ-LLORCA, L.V.; JANSSON, H.B.; SALINAS, J.; PARK, J.O.; SIVASITHAMPARAM, K. Colonisation of seminal roots of wheat and barley by egg-parasitic nematophagous fungi and their effects on *Gaeumannomyces graminis*var.*tritici*and development of root-rot. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.37, p.1229-1235, 2005.

MORARU, R.; POURCHER, A.M.; JADAS-HECART, A.; KEMPF, I.; ZIEBAL, C.; KERVARREC, M.; COMUNAL, P.Y.; MARES, M.; DABERT, P. Changes in Concentrations of Fluoroquinolones and of Ciprofloxacin-resistant Enterobacteriaceae in Chicken Feces and Manure Stored in a Heap. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 41, n. 3, p. 754-763, May-Jun 2012.

MOSONI, P.; DURAND, F.C.; MAILLET, C.B.; FORANO, E. Quantification by real-time PCR of cellulolytic bacteria in the rumen of sheep after supplementation of a forage diet with readily fermentable carbohydrates: effect of a yeast additive. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 6, n. 103, p. 2676–2685, 2007.

MOUGIN, C.; CHEVIRON, N.; REPINCAY, C.; HEDDE, M.; HERNANDEZ-RAQUET, G. Earthworms highly increase ciprofloxacin mineralization in soils. **Environmental Chemistry Letters,** Collingwood, v. 11, n. 2, p. 127-133, Jun 2013.

MUYZER, G.; DE WAAL, E.C.; UITTERLINDEN, A.G. Profiling of complex microbial population by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 59, p.695-700, Mar 1993.

NOWARA, A.; BURHENNE, J.; SPITELLER, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, DC, v.45. p.1459-1463, Apr 1997.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guideline 217 - Guideline for the testing of chemicals**. Soil microorganism: carbon transformation test. Paris, 2000.10 p.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Technologies to mitigate the environmental impact of broiler production. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 37, n. esp., p. 239-252, Jul 2008.

PEREIRA, L.A.; JARDIM, I.C.S.F.; FOSTIER, A.H.; RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, São Paulo, v.35, n.1, p.159-169, Sep 2012.

PEREIRA LEAL, R.M.; ALLEONI, L.R.F.; TORNISIELO, V.L.; REGITANO, J.B. Sorption of fluoroquinolones and sulfonamides in 13 Brazilian soils. **Chemosphere,** Oxford, v. 92, n. 8, p. 979-985, Aug 2013.

PETTERSSON, M.; BAATH, E. The rate of change of a soil bacterial community after liming as a function of temperature. **Microbial Ecology,** Oslo, v. 46, n. 2, p. 177-186, Aug 2003.

PHILLIPS, I.; CASEWELL, M.; COX, T.; de GROOT, B.; FRIIS, C.; JONES, R. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v.53, p.28-52, Jan 2004.

PICO, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil - risks and challenges. **Analytical and BioAnalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, Feb 2007.

PILS, J.R.V.; LAIRD, D.A. Sorption of tetracycline and chlortetracycline on K- and Ca-saturated soil clays, humic substances, and clay-humic complexes. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 41, n. 6, p. 1928-1933, Mar 2007.

POURCHER, A.M.; JADAS-HECART, A.; COTINET, P.; DABERT, P.; ZIEBAL, C.; LE ROUX, S.; MORARU, R.; HEDDADJ, D.; KEMPF, I Effect of land application of manure from enrofloxacin-treated chickens on ciprofloxacin resistance of Enterobacteriaceae in soil. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 482, p. 269-275, Jun 1 2014.

PU, X.C.; CUTRIGHT, T.J. Sorption-desorption behavior of PCP on soil organic matter and clay minerals. **Chemosphere**, Oxford, v. 64, n. 6, p. 972–983, Feb 2006.

REGITANO, J.B.; PEREIRA LEAL, R.M. Performance and environmental impact of antibiotics in animal production in Brazil. **Revista Brasileira de Ciênciado Solo,** Viçosa, v. 34, n. 3, p. 601-616, may-jun 2010.

RIAH-ANGLET, W.; TRINSOUTROT-GATTIN, I.; MARTIN-LAURENT, F.; LAROCHE-AJZENBERG, E.; NORINI, M.P.; LATOUR, X.; LAVAL, K. Soil microbial community structure and function relationships: A heat stress experiment. **Applied Soil Ecology,** Amsterdam**,** v. 86, p. 121-130, Feb 2015.

RODRIGUES-SILVA, C.; MANIERO, M.G.; GUIMARAES, J.R. Evaluation of residual antimicrobial activity of flumequine solutions subjected to electrochemical and photo-electrochemical processes. **Química Nova,** São Paulo, v. 37, n. 5, p. 789-795, Jun 2014.

RODRIGUEZ, A.; MUNOZ, I.; PERDIGON-MELON, J.A.; CARBAJO, J.B.; MARTINEZ, M.J.; FERNANDEZ-ALBA, A.R. Environmental optimization of continuous flow ozonation for urban waste-water reclamation. **Scienceof theTotal Environment**, Amsterdam, v.437, p. 68-75, Oct 2012.

ROSENDAHL, I.; SIEMENS, J.; GROENEWEG, J.; LINZBACH, E.; LAABS, V.; HERRMANN, C.; VEREECKEN, H.; AMELUNG, W. Dissipation and Sequestration of the Veterinary Antibiotic Sulfadiazine and Its Metabolites under Field Conditions. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 45, n. 12, p. 5216-5222, Jun 2011.

SARMAH, A.K.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (Vas) in the environment. **Chemosphere**, Oxford, v.65, p.725-759, Oct 2006.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. Principal components analysis in the software Assistat - Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, Reno, NV. St. Joseph: ASABE, 2009.

SILVA, L.G. **Uso e monitoramento de indicadores microbiológicos para avaliação da qualidade dos solos de cerrado sob diferentes agroecossistemas**. 2008. 137f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2008.

SOUFI, L.; SAENZ, Y.; VINUE, L.; ABBASSI, M.S.; RUIZ, E.; ZARAZAGA, M.; BEN HASSEN, A.; HAMMAMI, S.; TORRES, C. Escherichia coli of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. **International Journal of Food Microbiology,** Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 497-502, Jan 2011.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, Sep 2011.

STOLL, C.; SIDHU, J.P.S.; TIEHM, A.; TOZE, S. Prevalence of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Surface Water Samples Collected from Germany and Australia. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 46, n. 17, p. 9716-9726, Sep 4 2012.

STORTEBOOM, H.; ARABI, M.; DAVIS, J.G.; CRIMI, B.; PRUDEN, A. Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, And Pristine Sources. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 44, n. 19, p. 7397-7404, Oct 2010.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PROFUMO, A. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1217, n. 47, p. 7316-7322, Nov 2010.

SUN, S.P.; GUO, H.Q.; KE, Q.; SUN, J.H.; SHI, S.H.; ZHANG, M.L. Degradationof antibiotic ciprofloxacin hydrochloride by photofenton oxidation process. **Environmental Engineering Science**, New Rochelle, v. 26, p. 753–759, Mar 2009.

TAO, R.; YING, G.-G.; SU, H.-C.; ZHOU, H.-W.; SIDHU, J.P.S. Detection of antibiotic resistance and tetracycline resistance genes in Enterobacteriaceae isolated from the Pearl rivers in South China. **Environmental Pollution**, London, v. 158, n. 6, p. 2101-2109, Jun 2010.

THIELE, S. Adsorption of the antibiotic pharmaceutical compound sulfapyridine by a long-term differently fertilized loess Chernozem. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Berlin, v. 163, n. 6, p. 589-594, Dec 2000.

THIELE-BRUHN, S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - A review.**Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, Berlin, v. 166, n. 4, p. 145-167, Aug 2003.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, Sep 2001.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v.5, p.240–245, Jun 2002.

TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J.L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, Mar 2006.

VAN DOORSLAER, X., DEWULF, J., VAN LANGENHOVE, H., DEMEESTERE, K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 500, p. 250-269, Dec 2014.

VASUDEVAN, D.; BRULAND, G.L.; TORRANCE, B.S.; UPCHURCH, V.G.; MACKAY, A. pH-dependent ciprofloxacin sorption to soils: Interaction mechanisms and soil factors influencing sorption. **Geoderma**, Amsterdam, v. 151, n. 3-4, p. 68-76, Jul 2009.

VERLICCHI P, A.L.; AUKIDY, M.; GALLETTI, A.; PETROVIC, M.; BARCELÓ D. Hospital effluent: investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. **Scienceof theTotal Environment,** Amsterdam, v.430, p. 109-118, Jul 2012.

WALTERS, E.; MCCLELLAN, K.; HALDEN, R.U. Occurrence and loss over three years of 72 pharmaceuticals and personal care products from biosolids-soil mixtures in outdoor mesocosms. **Water Research,** Oxford, v. 44, n. 20, p. 6011-6020, Dec 2010.

WANG, C.-J.; LI, Z.; JIANG, W.-T. Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 53, n. 4, p. 723-728, Oct 2011.

WHO.**Critically important antimicrobials for human medicine**. 3. ed. Geneva, Switzerland, 2012.

WU, Q.; LI, Z.; HONG, H.; YIN, K.; TIE, L. Adsorption and intercalation of ciprofloxacin on montmorillonite. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 50, p. 204-211, Oct 2010.

XIE, Y.F.; LI, X.W.; WANG, J.F.; CHRISTAKOS, G.; HU, M.G.; AN, L.H. Spatial estimation of antibiotic residues in surface soils in a typical intensive vegetable cultivation area in China. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v.430, p.126-131, Jul 2012.

ZHANG, J.; LI, Z.; GE, G.; SUN, W.; LIANG, Y.; WU, L. Impacts of soil organic matter, pH and exogenous copper on sorption behavior of norfloxacin in three soils. **Journal of Environmental Sciences,** Beijing, v. 21, n. 5, p. 632-640, Jul 2009.

ZHAO, L.; DONG, Y. H.; WANG, H. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 408, n. 5, p. 1069-1075, Feb 2010.

ZHOU, L.-J.; YING, G.-G.; LIU, S.; ZHANG, R.-Q.; LAI, H.-J.; CHEN, Z.-F.; PAN, C.-G. Excretion masses and environmental occurrence of antibiotics in typical swine and dairy cattle farms in China. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 444, p. 183-195, Feb 2013.

ZHOU, X.; CHEN, C.; YUE, L.; SUN, Y.; DING, H.; LIU, Y. Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 272-277, Nov 2008.

ZILLI, J.E.; RUMJANEK, N.G.; COUTINHO, H.L.C.; NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência e Tecnologia**, Brasília, DF, v.20, p.391-41, Sep-Dec 2003.

4. Estudo de ambiente aquático contaminado por fluoroquinolonas

Resumo

A presença de fluoroquinolonas (FQs) no ambiente advindo da aplicação da cama de aviário contaminada com fármacos (fertilizante orgânico) ou do escoamento superficial desses compostos oriundos da produção pecuária pode contaminar corpos hídricos. Com isso, o objetivo deste trabalho foi quantificar três antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas em corpos hídricos: norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e ciprofloxacina (CIP) em condições reais de produção. Foram selecionadas seis granjas na região de Piracicaba/SP para coleta de amostras de água superficial, água subsuperficial (4 m de profundidade) e sedimento em lagos adjacente aos galpões de produção de frango de corte. A determinação dos antimicrobianos foi realizada empregando um método de extração em fase sólida acoplado à cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (*on-line*-SPE-LC-MS/MS). As amostras de água (superficial e subsuperficial) apresentaram resultados inferiores ao limite de quantificação (20 ng L^{-1}). Em sedimento foram detectados valores entre 22,6 e 76,5 ng kg^{-1} de FQs. Concluiu-se que a administração de FQs em frango de corte contamina os corpos hídricos adjacentes aos galpões de produção, pois houve acúmulo de ENR e NOR em sedimento (ng kg^{-1}).

Palavras-chave: Corpos hídricos. Água superficial. Água subsuperficial. Sedimento.

Abstract

The presence of fluoroquinolones (FQs) into the environment from manure contaminated with antimicrobials (as organic fertilizer) or run off of these compounds coming from livestock production can contaminate water bodies. The objective of this study was to quantify three antimicrobial of FQs group in water bodies: norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP) in real conditions of production. Six farms were selected in Piracicaba/SP to collect surface water, subsurface water (4 m deep) and sediment samples in lakes adjacent to broiler production sheds. The determination of antimicrobials was performed using an online solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method (on-line SPE-LC-MS/MS). Water samples (surface and subsurface) showed lower results than the quantification limit (20 ng L^{-1}). FQs concentration in sediment samples were from 22.6 to 76.5 ng kg^{-1}. It was concluded that administration of FQs to broiler can contamine water bodies near the farm, because there were accumulation of ENR and NOR in sediment (ng kg^{-1}).

Keywords: Water bodies. Surface water. Subsurface water. Sediment.

4.1 Introdução

Há preocupação crescente com os antimicrobianos, pois os relatos de poluição ambiental têm aumentado nos últimos anos (RUTGERSSON, et al., 2014). As consequências da descarga de resíduos farmacêuticos no ambiente ainda não estão completamente esclarecidas, mas podem, sem dúvida, ter efeitos sobre a vida selvagem, comunidade microbiana e podem causar a seleção e dissiminação de microrganismos resistentes (HARTMANN et al., 1998; RIZZO et al., 2013; BENGTSSON-PALME et al., 2014). Os fármacos detectados no ambiente pertencem a praticamente todas as classes terapêuticas existentes (GUILLÉN et al., 2012), com relatos de contaminação em efluentes de estações de tratamento de águas residuais (GROS et al., 2006; GRACIA-LOR et al., 2011; LÓPEZ-SERNA et al., 2012) e em rios e lagos ao redor do mundo (MADUREIRA et al., 2010; VAZQUEZ-ROIG et al., 2012). A maioria dos corpos hídricos está localizada em ambiente rural, destacando a preocupação sobre a contaminação com os agentes antimicrobianos usados na pecuária. Na região de Piracicaba (SP/Brasil) a produção de frango de corte é intensa e o uso de antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas (FQs) é constante, principalmente a norfloxacina (NOR) e enrofloxacina (ENR). Nas granjas é comum a presença de represas, lagos ou riachos com potencial de recebimento de água proveniente de lavagem de granjas ou de drenagem próximos aos galpões de produção de frango de corte, onde há uso destes fármacos veterinários. Estes corpos hídricos podem ser utilizados pelo próprio produtor ou por outros usuários de recursos hídricos à jusante. Essa água pode ser utilizada ainda para a dessedentação de animais ou irrigação de hortas. Assim, a hipótese deste trabalho é que as FQs utilizadas na produção de frangos de corte atingem os corpos d'água próximos aos galpões, representando um potencial efeito nocivo a todos que consomem essa água. O objetivo do trabalho foi determinar a presença e a concentração dos antimicrobianos NOR, ENR e ciprofloxacina (CIP), que é o principal metabólito da ENR, em água superficial, subsuperficial e sedimento de corpos hídricos adjacentes às granjas.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em águas superficiais, subsuperficial e sedimento

A) Coleta e análise de águas superficiais

Para o desenvolvimento e validação do método analítico foram coletadas amostras de água superficial em lago isento de antimicrobianos (branco). Após a validação, as demais amostragens foram realizadas em seis granjas que apresentaram lago adjacente aos barracões de produção (com três repetições) nos municípios de Piracicaba, Saltinho e Tietê (SP/Brasil).

O procedimento de coleta foi por meio de frascos âmbar previamente lavados e identificados. Foram adicionados 0,2 g de Na_2EDTA nas amostras de água para evitar que os metais mascarassem os antimicrobianos presentes nas amostras (MAMANI, 2007). Após as coletas, as amostras foram levadas para o Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo (CENA/USP), onde 100 mL de água por amostra foi filtrada em membrana de Teflon® de 0,22 µm para eliminar material particulado. Em seguida, ajustou-se o pH para 4,0 com ácido ortofosfórico e procedeu-se a determinação dos antimicrobianos. As amostras foram analisadas no mesmo dia.

B) Coleta de água subsuperficial

Em uma das granjas entre as previamente selecionadas (Piracicaba/SP) foi instalado um poço piezométrico com profundidade de 4 m, em uma área localizada a 50 m do barracão de produção que recebe e infiltra a água de drenagem/lavagem do galpão. As coletas de água foram realizadas por meio de uma bomba elétrica, sempre após os eventos de chuva, totalizando cinco coletas no período de seis meses. Para as coletas foram utilizados frascos âmbar previamente lavados, identificados e com adição de Na_2EDTA. O procedimento de preparo das amostras de água subsuperficial foram os mesmos procedimentos das amostras de água superficial. Foram analisados os antimicrobianos NOR, ENR e CIP com o objetivo de avaliar a ocorrência de lixiviação dessas moléculas em campo.

C) Coleta e análise de sedimento

Para desenvolvimento e validação do método analítico foram coletadas amostras de sedimento sem a presença dos antimicrobianos NOR, ENR e CIP (branco). As coletas de sedimento foram feitas, em triplicata, em lagos próximo aos barracões de produção de frango

de corte em três granjas selecionadas. Após a amostragem, o sedimento foi colocado em um balde limpo, homogeneizado, identificado e uma porção de cada amostra (aproximadamente 200 g) foi enviada ao Laboratório de análises químicas Pirasolo - Laboratório Agrotécnico Piracicaba S/C Ltda para análises químicas: pH, MO (matéria orgânica), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio), SB (soma de bases) e CTC (capacidade de troca catiônica) e física (textura do solo). A porção restante foi levada ao Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP) onde foi liofilizada e, depois de seca, peneirada em peneira de 2 mm para posterior processo de extração e análise em LC-MS/MS com extração em fase sólida em linha.

4.2.2 Desenvolvimento da metodologia analítica para análise de NOR, ENR e CIP em água e sedimento por SPE-LC-MS/MS

Solventes e Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados foram metanol (MeOH) e acetonitrila (ACN) grau HPLC (Tedia®), ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemicals®), ácido fórmico (JT Baker®), Na_2EDTA (Sigma-Aldrich®), ácido cítrico monohidratado e citrato de sódio di-hidratado (JT Baker®), todos os reagentes de grau analítico, cartucho SPE Strata SAX de 500 mg/6 mL (Phenomenex®). A água usada foi purificada através de um sistema de água Milli-Q (Millipore®).

Os padrões analíticos de CIP 99,5%, ENR 99,0%, NOR 99,0% e o padrão interno sulfadimetoxina-d6 (SDM-D6) 99,4% foram adquiridos da Fluka Analytical®.

Foram preparadas soluções-estoque de 100 µg mL^{-1} para cada analito em MeOH e mantidas a -20º C, em frasco de vidro âmbar por até 6 meses. Uma solução de 1000 µg L^{-1} foi preparada em água para ser utilizada no método de água. As soluções ficaram sob refrigeração e foram renovadas semanalmente. As soluções de trabalho com concentrações entre 1,0 µg L^{-1} e 50 µg L^{-1} foram preparadas em água de rio e em água ultrapura, ambas com o pH ajustado para 4,0 utilizando ácido ortofosfórico. Todas as soluções foram estocadas em refrigerador a 3° C.

Condições cromatográficas

Sistema: *on-line*-SPE-LC-ESI-MS/MS (*On-line Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry*).

Equipamento: Cromatógrafo em fase líquida Agilent®, equipado com bomba quaternária, bomba binária, injetor automático, degaseificador, forno de colunas e válvula de 10 portas.
Espectrômetro de Massas Triplo Quadrupolo 6430 LC-MS/MS Agilent®.
Coluna para separações cromatográficas: Agilent Zorbax Eclipse C18 (3 x 100 mm; 3,5 µm).
Coluna de carregamento (SPE-*on-line*): Cartucho Zorbax 80 SB-C8 (9,4 x 15 mm; 7 µm).
Níveis de fortificação (água): 100 e 200 ng L^{-1}
Níveis de fortificação (sedimento): 20, 50 e 200 ng kg^{-1}
Temperatura do forno: 30º C
Volume de injeção: 900 µL

Espectrometria de massas

Para análise por espectrometria de massas foi utilizado um Espectrômetro Triplo Quadrupolo 6430 LC/MS. A fonte de ESI foi operada no modo positivo de ionização e seus parâmetros foram: temperatura do gás a 350ºC; vazão de gás de 10 L min^{-1}; gás nebulizador a 43 psi e tensão capilar de 3500 V. O nitrogênio foi utilizado como nebulizador (grau analítico) e gás de colisão. Para aquisição dos dados foi utilizado o software Agilent Mass Hunter. A detecção foi realizada por monitoramento de reações múltiplas (MRM).

Para a seleção do íon precursor e dos íons produto foi realizada uma injeção de 10 µL de solução padrão de antimicrobiano (10 µg mL^{-1} em ACN) diretamente no espectrômetro de massas. As fases móveis foram (A) H_2O ultrapura (0,1% ácido fórmico) e (B) ACN (0,1% ácido fórmico) (A:B, 50:50, v/v). A vazão foi constante e igual a 0,6 mL min^{-1}. Diferentes energias de fragmentação (de 50 a 200 V) e diferentes energias de colisão (de 0 a 120 V) foram investigadas para cada analito. A partir do íon precursor, duas diferentes transições de maior abundância foram selecionadas (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Parâmetros otimizados para as fluoroquinolonas estudadas.

Antimicrobiano e massa molar (g mol^{-1})	**Íon precursor**	**Íon produto 1**	**Energia de colisão 1 (V)**	**Íon produto 2**	**Energia de colisão 2 (V)**	**E.F. (V)***
Norfloxacina 319,1	320,1	302,1	16	276,2	12	125
Enrofloxacina 359,4	360,2	342,0	18	245,1	24	120
Ciprofloxacina 331,1	332,1	245,1	22	288	13	125

* Energia de Fragmentação

Coluna preparatória (bomba quaternária)

Coluna de carregamento e pré concentração da amostra: Zorbax 80 SB-C8 (9,4 x 15 mm; 7 µm).

Volume de injeção da amostra: 900 µL.

Fase móvel: A - H_2O ultrapura (pH 4,0) e B - MeOH.

Vazão: 1,0 mL min^{-1}.

Gradiente: início com 5% de B por 2 min, depois o gradiente foi alterado para 20% de B até 4 min com a finalidade de limpar a amostra retida na coluna, após 4 min a proporção voltou para 5% de B para economizar o solvente. Passados 10 min a fase móvel foi alterada para 90% de B por 3 min.

Temperatura da Coluna: 30º C

Tempo de viragem da válvula: até 3 min a válvula foi mantida na posição 2, com o fluxo direcionado para a coluna de carregamento. Após 3 min, a válvula foi mantida na posição 1, onde o fluxo da bomba binária no sentido inverso, eluiu os analitos da coluna de carregamento para a coluna analítica e em seguida para detecção no LC-MS/MS.

Separação dos analitos (bomba binária)

Coluna: Zorbax Eclipse Plus C18 (3 x 100 mm; 3,5 µm).

Fase móvel: A - H_2O ultrapura (0,1% ácido fórmico) e B - ACN (0,1% ácido fórmico).

Vazão: 0,4 mL min^{-1}.

Gradiente: iniciando com 20% de B até 5 min com gradiente linear até 80% de B em 12 min, permanecendo constante por mais 3 min. Depois da corrida a coluna ficou em reequilíbrio por 10 min com 20% de B.

Método de extração de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em água e sedimento

A. Método de extração de fluoroquinolonas em água superficial e subsuperficial

Foi corrigido o pH das amostras para 4,0 com ácido ortofosfórico e as amostras foram filtradas diretamente em *vials* através de filtro de Teflon® modificado (PVDF 0,22 µm). Em seguida, as amostras foram analisadas por SPE-LC-MS/MS nas condições já estabelecidas.

B. Método de extração de fluoroquinolonas em sedimento

O método de extração que se mostrou mais eficaz, com melhor recuperação dos analitos, foi o método de Zhou et al. (2011); adaptado por Monteiro (2014) para a matriz sedimento.

Foi pesado 2 g de sedimento previamente liofilizado em frascos de Teflon® de 25 mL. Após este procedimento, foi adicinado 10 mL de ACN + 10 mL de tampão citrato pH 3,0 e foi homogeneizado em vórtex por 1 min. Em seguida, foi colocado em banho de ultrassom por 15 min e depois as amostras foram centrifugadas por 10 min a 10000 rpm. Após, procedeu-se a transferência do sobrenadante para balão de fundo redondo de 250 mL contendo 0,2 g de Na_2EDTA. O processo de extração foi repetido três vezes e transferidos os sobrenadantes no mesmo balão. Após este procedimento, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo a 40º C até a eliminação de toda ACN (quantidade < 5%). Por último, o extrato remanescente foi reconstituído para volume final de 50 mL com água ultrapura.

Tampão citrato pH 3,0:

Solubilizou-se 57,4 g de ácido cítrico monohidratado e 17,6 g de citrato de sódio dihidratado em 1 L de água ultrapura.

Processo de purificação do extrato:

Os cartuchos SPE Strata SAX de 500 mg/6 mL Phenomenex® foram condicionados com 10 mL de MeOH e, em seguida, com 10 mL de água ultrapura. A água remanescente do cartucho foi eliminada utilizando bomba à vácuo por 30 s. Transferiu-se 6 mL do extrato aquoso proveniente do processo de extração para o cartucho e o eluato foi coletado em tubo de vidro. Em seguida, filtrou-se 2 mL do eluato diretamente em *vials* através de filtro de Teflon® modificado (PVDF 0,22 µm) e procedeu-se análise por SPE-LC-MS/MS nas condições pré estabelecidas (mesmas condições da análise de águas superficiais e subsuperficiais).

4.2.3 Validação da metodologia analítica para análise de fluoroquinolonas (NOR, ENR e CIP) em água e sedimento por SPE-LC-MS/MS

Para assegurar a confiabilidade do método foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, recuperação e precisão.

Seletividade

A seletividade do método foi verificada com injeções dos extratos de água e sedimento "branco" (sem adição de antimicrobianos). As amostras de água e de sedimento não apresentaram interferentes superiores a 30% do limite de quantificação nos mesmos tempos de retenção dos compostos analisados, o que torna o método seletivo (Figuras 4.1 e 4.2).

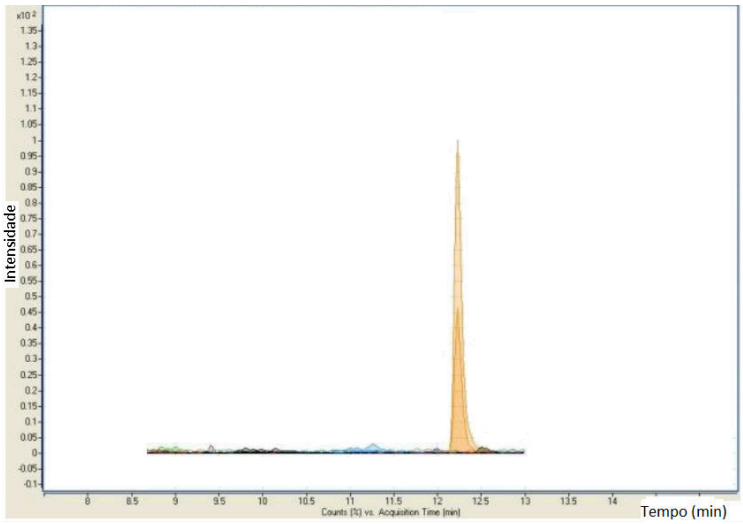


Figura 4.1 - Cromatograma da matriz água “branco”, com o pico correspondente ao padrão interno (sulfadimetoxina-D6).

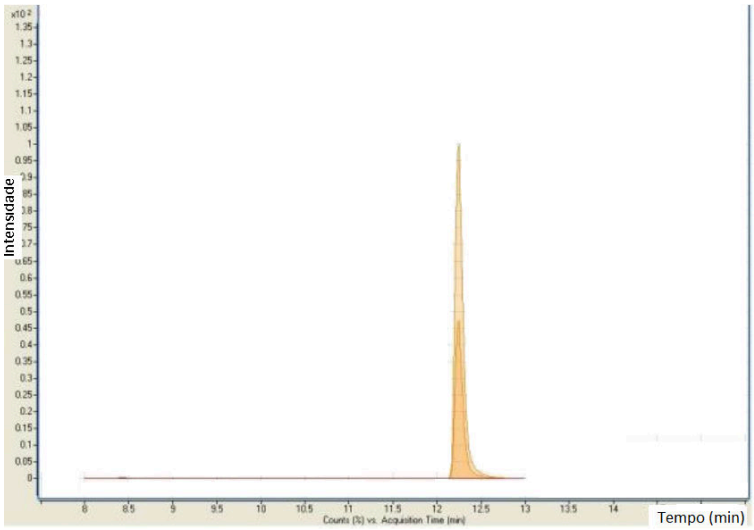


Figura 4.2 - Cromatograma da matriz sedimento “branco”, com o pico correspondente ao padrão interno (sulfadimetoxina-D6).

Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi avaliada a partir de curvas analíticas com os três fármacos nas concentrações 20, 50, 100, 200 e 500 ng L^{-1} para a matriz água e 20, 50, 100, 200 e 500 ng kg^{-1} para a matriz sedimento. Cada solução foi injetada com sete repetições (Tabelas 4.2 e 4.3).

Um padrão interno deuterado, Sulfadimetoxina-D6, foi utilizado para a construção das curvas analíticas. As curvas foram construídas com a relação da área dos analitos e do composto deuterado na concentração de 100 ng L^{-1} para água e 100 ng kg^{-1} para sedimento em todas as soluções. A linearidade foi expressa pelos valores dos coeficientes de correlação, os quais estiveram dentro do valor considerado adequado (r^2 >0,99).

Tabela 4.2 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r^2) para as FQs estudadas em água

ANTIMICROBIANO	Equação da reta	r^2
Norfloxacina	y = 0,4523x + 0,2434	0,9977
Enrofloxacina	y = 0,4671x + 0,1747	0,9987
Ciprofloxacina	y = 0,1704x + 0,0949	0,9995

Tabela 4.3 - Equações das retas e coeficientes de correlação (r^2) para as FQs estudadas em sedimento.

ANTIMICROBIANO	Equação da reta	r^2
Norfloxacina	y = 0,0014x + 0,0099	0,9978
Enrofloxacina	y = 0,0025x + 0,0013	0,9992
Ciprofloxacina	y = 0,0011x + 0,0208	0,9987

Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados individualmente para cada analito utilizando o recurso do equipamento que permite o cálculo da relação entre a resposta do equipamento para o analito e o ruído obtido nas mesmas condições (sinal-ruído). O limite de detecção (LD) foi três vezes superior ao ruído da linha de base e o limite de quantificação (LQ) dez vezes este valor (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os fármacos de interesse.

Produto	LD	LQ
	----------ng kg^{-1}----------	
Norfloxacina	4,17	13,75
Enrofloxacina	4,11	13,56
Ciprofloxacina	5,08	16,78

Recuperação e precisão

Os ensaios de recuperação e precisão foram realizados utilizando amostras de água e sedimento, ambos isentos de antimicrobianos (testemunha). Foram realizados estudos de recuperação em 2 níveis para água (100 ng L^{-1} e 200 ng L^{-1}) e 3 níveis para sedimento (20, 50 e 200 ng kg^{-1}), com sete replicatas. Os valores das médias das recuperações devem estar na faixa de 70 - 120% (União Européia, 2002/657, EUROPEAN COMISSION, 2002).

As precisões foram avaliadas em termos de repetitividade (intra-dia) dos resultados e precisão intermediária (inter-dia). As precisões foram medidas através do coeficiente de variação (CV%) entre as repetições (Tabelas 4.5 e 4.6).

Amostras branco de água e de sedimento foram fortificadas utilizando soluções dos analitos com pH ajustado para 4,0 com ácido ortofosfórico (Figuras 4.3 e 4.4).

Tabela 4.5 - Valores de recuperação e precisão (CV%) (n=7) para os analitos, na matriz água.

Antimicrobiano	Níveis Fortificação (ng L^{-1})	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
		----------intra-dia----------		----------inter-dia----------	
NOR	100	87,8	7,6	81,5	19,6
	200	100,8	3,7	-	-
ENR	100	69,7	5,3	64,2	20,0
	200	86,7	3,0	-	-
CIP	100	80,6	7,4	69,6	8,9
	200	101,5	1,3	-	-

Tabela 4.6 - Valores de recuperação e precisão (CV%) (n=7) para os analitos, na matriz sedimento.

Antimicrobiano	Níveis Fortificação (ng kg^{-1})	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
		----------intra-dia----------		----------inter-dia----------	
NOR	20	101,9	5,4	-	-
	50	101,6	6,9	98,2	6,4
	200	111,3	4,0	-	-
ENR	20	108,9	1,8	-	-
	50	105,7	4,0	99,0	8,2
	200	94,7	6,6	-	-
CIP	20	107,0	3,2	-	-
	50	106,3	5,8	102,6	6,9
	200	110,0	3,8	-	-

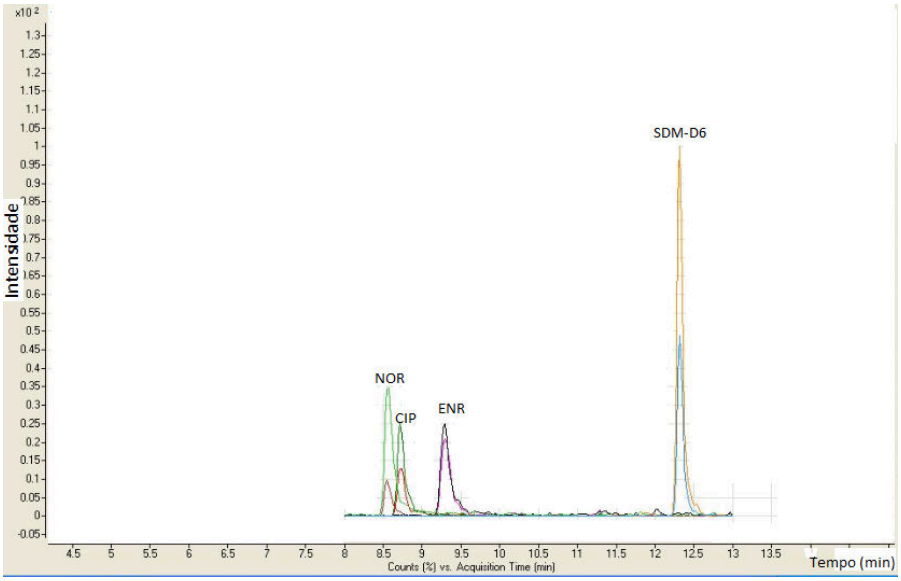


Figura 4.3 - Cromatograma da matriz água fortificada com NOR, ENR e CIP na concentração 100 ng L^{-1} e o padrão interno (sulfadimetoxina-D6).

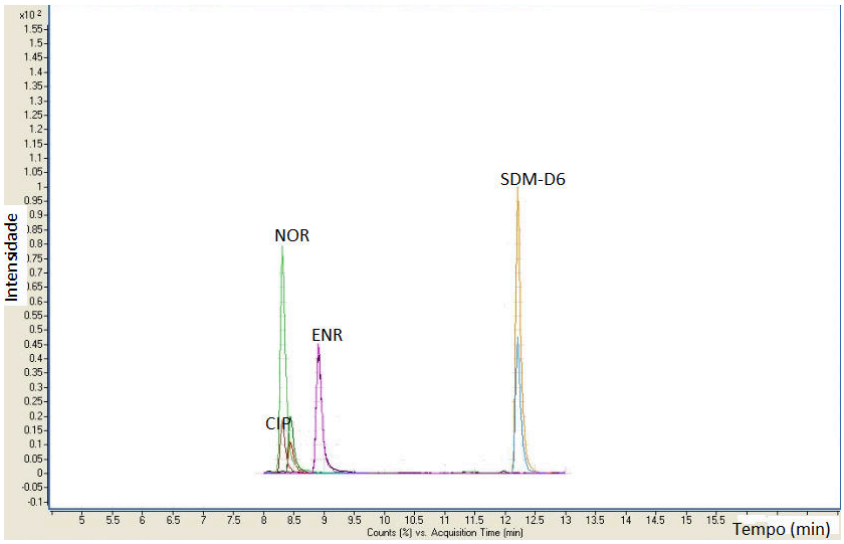


Figura 4.4 - Cromatograma da matriz sedimento fortificada com NOR, ENR e CIP na concentração 200 ng kg^{-1} e o padrão interno (sulfadimetoxina-D6).

4.2.4 Análise estatística

As coletas de água e sedimento foram realizadas ao acaso. Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO; 2009).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Determinação de NOR, ENR e CIP em águas superficiais e subsuperficial

Embora a água de escoamento superficial, proveniente de chuva e/ou lavagem tenha atingido os corpos d'água nas imediações do barracão, todas as amostras (18 amostras superficiais e 5 subsuperficiais) apresentaram resultados inferiores ao limite de quantificação (20 ng L^{-1}).

A presença de FQs em águas superficiais ou em profundidade ainda é controversa. Em trabalhos em que não houve detecção de FQs, a explicação apresentada foi que tais compostos ficam fortemente adsorvidos no sedimento desses corpos d'água (TOLLS, 2001; ANDREOZZI et al., 2003), evitando sua dispersão em água. Assim, a adsorção desses compostos pode reduzir a contaminação de águas superficiais e subsuperficiais (ZHOU et al., 2008). Porém concentrações elevadas de FQs em ambiente adjacente podem levar à sua dispersão nas águas de rios e lagos (KOLPIN et al., 2003, MIAO et al., 2004; FICK et al., 2009; TEIJON et al., 2010; LÓPEZ-SERNA et al., 2012; VAN DOORSLAER et al., 2014).

Foram encontradas concentrações entre 0,06-0,08 µg L^{-1} de NOR e 0,06-0,07 µg L^{-1} de CIP em amostras de água superficial de quatro países (França, Grécia, Suécia e Itália) com

valores de período de meia-vida de 10,6 dias. Esses valores foram considerados elevados em decorrência da fotólise dessas moléculas na camada superficial dos corpos hídricos (ANDREOZZI et al., 2003). A CIP tem sido o composto do grupo das FQs mais citado devido a sua ampla utilização médica e, no caso de uso veterinário, como principal metabólito da ENR. Entretanto, a contaminação de águas de superfície tem sido relatada mais como consequência do uso indiscriminado de fármacos veterinários e não ao uso humano desses medicamentos: em atividades de aquicultura, as concentrações de FQs variaram entre 0,5 ng L^{-1} até 6,5 mg L^{-1}, sendo as maiores concentrações em águas superficiais (LI, et al., 2011; VAN DOORSLAER et al., 2014).

No entanto, na região de Patancheru (Índia), em águas superficiais e subsuperficiais, foram detectadas concentrações de CIP (0,7 a 14 mg L^{-1}) e de NOR (até 0,52 mg L^{-1}) provenientes de uso médico devido à alta densidade populacional e por poluição causada por uma fábrica de FQs na região e (FICK et al., 2009; TEIJON et al., 2010; LÓPEZ-SERNA et al., 2012). Em águas superficiais de Maryland (EUA) foram detectados concentrações de CIP (8,9 a 102 ng L^{-1}) e ENR (4,1 a 15,6 ng L^{-1}) (HE, BLANEY, 2015). Já na região metropolitana de Barcelona foram detectados até 0,5 mg L^{-1} de CIP em águas subterrâneas causada pela alta densidade populacional (TEIJON et al., 2010; LÓPEZ-SERNA et al., 2012).

As principais causas da contaminação são o escoamento superficial (SPELTINI et al., 2011) e a percolação de fármacos oriundos da adubação com fertilizantes orgânicos contendo FQs (WU et al., 2010). Para Zhou et al. (2008), a persistência de FQs no ambiente deve-se ao retardo no seu processo de biodegradação, uma vez que elas ficam sorvidas em solos/sedimentos, justificando longos períodos de meia-vida. Além disso, muitas áreas com potencial de contaminação não estão sendo monitoradas e as FQs presentes no ambiente podem atingir diretamente a população através da água potável (FICK et al., 2009). Alguns autores sugerem que a exposição direta aos produtos farmacêuticos em níveis normalmente encontrados na água potável (até 100 ng L^{-1}) não representa riscos à saúde humana (WEBB et al., 2003). No entanto, vários trabalhos encontraram concentrações de FQs em ecossistemas aquáticos muito acima dos citados por esses autores. No caso do presente estudo, não foram detectados fármacos (NOR, ENR e CIP) nos corpos hídricos avaliados, indicando que no período avaliado não houve riscos para a ingestão humana.

Concentrações elevadas de FQs são geralmente detectadas em águas oriundas de hospitais. Em alguns estudos, os autores relataram valores que variaram entre 3 e 87 µg L^{-1} desses fármacos (HARTMANN et al., 1998). Comparativamente, concentrações mais baixas são relatadas para águas residuais municipais, como os valores encontrados por Golet et al.,

(2002) que variaram entre 49 e 405 ng L^{-1} para CIP e NOR (Suíça) e por Lee et al. (2007) que variaram entre 40 e 2148 ng L^{-1} para CIP e NOR (Canadá).

Não foram encontrados trabalhos relatando os efeitos tóxicos dos metabólitos formados no processo de degradação dessas moléculas, que podem ser mais tóxicos e persistentes que os produtos originais (WEBB et al., 2003), com exceção da transformação de ENR em CIP, que já é um produto bem estudado e relatado na literatura.

Até o presente momento são poucos os estudos que estão envolvidos com processos de descontaminação de FQs em águas superficiais e subsuperficiais. Existem alguns grupos de pesquisa que estudam como as argilas podem ser usadas para remover fármacos do ambiente aquático, uma vez que esses componentes podem interagir e reter as FQs diminuindo sua disponibilidade no ambiente (GAO; PEDERSEN, 2005; ISABEL CARRETERO; POZO, 2009; LI, et al., 2011; WAN et al., 2013). Dos poucos estudos que monitoram a contaminação do ambiente, a maioria está relacionada às águas superficiais (LÓPEZ-SERNA et al., 2012).

Massmann et al. (2008) demonstraram que alguns produtos farmacêuticos podem persistir em ambientes aquáticos durante décadas e como a exposição à luz solar é considerado o fator mais importante para a degradação de FQs é provável que essas moléculas se mantenham estáveis em ambientes subterrâneos.

A persistência de FQs em corpos d'água pode causar problemas com a seleção de microrganismos ou genes de resistência (HARTMANN et al., 1998; RIZZO et al., 2013; BENGTSSON-PALME et al., 2014), assim como relatado em solos (BOXALL et al., 2003; VELICU; SURI, 2009; COLOMER-LLUCH et al., 2014). Há estudos em hospitais da Suíça indicando que concentrações entre 3 e 87 μg L^{-1} de CIP em água induziram a resistência no *lacZ*, gene bacteriano, em algumas espécies (HARTMANN et al., 1998). Os autores verificaram que a NOR também apresenta potencial de indução de resistência, mas o potencial da CIP superou todos os outros fármacos investigados. Outro estudo detectou mais de 81 genes de resistência induzidos pela presença de NOR (520 μg L^{-1}) e sulfonamidas em um lago indiano, sendo os mais comuns os genes *sul2* e *qnr* (BENGTSSON-PALME et al., 2014). Esses dados são preocupantes devido à transferência horizontal dos genes de resistência à outros grupos de bactérias, principalmente bactérias clinicamente relevantes.

Apesar de muitos autores terem relatado a presença FQs em água usada na agricultura (MARTINEZ et al., 2009), em águas residuais (SEIFRTOVÁ et al., 2008), água mineral (HERRERA-HERRERA et al., 2008), água não tratada e tratada (FOCAZIO et al., 2008), água de torneira (YIRUHAN et al., 2010) e água superficial (TONG et al., 2011), neste estudo não foi possível quantificar NOR, ENR e CIP em corpos d'água em granjas. No entanto, é

essencial analisar o sedimento desses corpos hídricos, pois esses fármacos podem estar adsorvidos e causar contaminação aos organismos aquáticos.

4.3.2 Determinação de NOR, ENR e CIP em sedimento

Foram detectadas uma ou mais FQs nos sedimento dos lagos das três granjas estudadas (Tabela 4.7). A ENR foi detectada nos três locais e com concentração superior a NOR na granja 3, o que pode significar ampla e intensa administração de ENR na produção avícola da região.

Tabela 4.7 - Concentração de NOR, ENR e CIP em sedimento de granjas produtoras de frango.

PRODUTOR	NOR	ENR	CIP
	----------ng kg^{-1}----------		
Granja 1	<LD	76,5 ±3,5	<LD
Granja 2	<LD	60,1 ±1,1	<LD
Granja 3	22,6 ±2,2	70,9 ±4,6	<LD

A presença de FQs nesta matriz indicou que houve contaminação dos corpos hídricos das granjas selecionadas, mas esses fármacos ficaram adsorvidos ao sedimento e não sofreram dispersão em água. A sorção de FQs em matrizes ambientais reduz potencialmente sua biodisponibilidade (HALLING-SORENSEN et al., 2002). Alguns autores corroboram com os dados encontrados neste trabalho, indicando que as FQs podem ficar retidas nos sedimentos fluviais (MARTINEZ, 2009), fortemente sorvidos a MO (FIGUEROA, 2004) e argilas (NOWARA et al., 1997; GIGER et al., 2003). No entanto, um estudo realizado na Califórnia (EUA) mostrou baixa afinidade de NOR ao sedimento quando comparada à ENR (CORDOVA-KREYLOS; SCOW, 2007).

Os valores de FQs detectados em sedimento, na faixa de ng kg^{-1}, foram muito menores que em solos (µg kg^{-1}). Duas situações poderiam explicar tal comportamento: 1) Menores concentrações de MO e de CTC em sedimento que traduziriam em menor capacidade de adsorção (Tabelas 3.14 e 3.15 e 4.8); 2) Proximidade do local do solo amostrado, que foi mais próximo ao barracão, com maior probabilidade de contaminação quando comparado ao sedimento de um lago mais distante. Considerando a primeira afirmação, mesmo com o pH baixo favorecendo a sorção das FQs nos sítios de carga negativa, os sedimentos apresentaram textura arenosa e baixa CTC (Tabela 4.9), agravado pela baixa quantidade de MO observada (Tabela 4.8).

Tabela 4.8 - Análises químicas dos sedimentos.

PRODUTOR	pH	MO	P resina	K	Ca	Mg	Soma Bases	CTC
	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------	----------	mmol$_c$ dm^{-3}	----------	----------
Granja 1	5,1	5	11	1,6	31	15	48	60
Granja 2	6,2	14	135	4,2	68	38	110	121
Granja 3	6,4	16	280	7,8	127	81	228	240

Tabela 4.9 - Análises físicas dos sedimentos.

PRODUTOR	Argila <0,002mm	Silte 0,05-0,002mm	Areia total 2,00-0,05mm
	----------	g kg^{-1}	----------
Granja 1	71	19	910
Granja 2	60	30	910
Granja 3	172	98	730

Valores de pH mais elevados em amostras de sedimento foram inversamente proporcionais ao coeficiente de sorção de FQs (LIN et al., 2004), uma vez que essas moléculas são anfóteras, portanto dependentes do pH (PICÓ; ANDRÉU, 2007). As concentrações detectadas de FQs em sedimento são altas (µg kg^{-1}) geralmente em produção intensiva de peixes, que recebem o fármaco diretamente (YANG et al., 2010, ZHOU et al., 2011; RICO et al., 2014). Yang et. al. (2010) observaram que em época chuvosa as concentrações de FQs em sedimento foram mais baixas, impossibilitando a sua detecção devido à diluição.

Em estudos de sorção de FQs, Zhou et al. (2011) detectaram a presença de ENR em dejetos e em sedimento lacustre de uma granja de suínos (Guangxi/China) com concentrações de 16,5 e 17,7 µg kg^{-1}, respectivamente. Diante destes valores, presume-se uma contaminação indireta do sedimento do lago devido à aplicação do dejeto ao redor do confinamento.

Não foi detectado CIP nas amostras de sedimento, apesar da presença da ENR (Tabela 4.7), indicando baixas taxas de degradação nesta matriz (LAI; LIN, 2009). Alguns autores afirmaram que a degradação fotolítica de FQs em sedimento só ocorre nos primeiros milímetros de profundidade e, mesmo assim, esse processo é bastante lento, com tempo de meia-vida entre 6 e 34 dias (LAI; LIN, 2009; XU et al., 2009). Também foram observadas baixas taxas de biodegradação devido a sorção das FQs ao sedimento, tornando as moléculas indisponíveis aos microrganismos (LAI; LIN, 2009; MARTINEZ, 2009; XU et al., 2009). Devido à persistência de FQs, vários trabalhos relataram pressão seletiva sobre as

comunidades bacterianas de sedimentos (CABELLO, 2006; YANG, et al., 2010; SUZUKI; HOA, 2012; SUMPRADIT et al., 2012; RICO et al., 2014).

Apesar das baixas concentrações detectadas de ENR e NOR em sedimento, é necessário um estudo de possíveis efeitos desses compostos em organismos aquáticos.

4.4. Conclusões

Os antimicrobianos NOR, ENR e CIP não puderam ser quantificados nas amostras de água superficial e subsuperficial (4 m de profundidade), pois os resultados foram inferiores ao limite de quantificação (20 ng L^{-1}). Foram detectados os compostos ENR e NOR em amostras de sedimento: níveis entre 60,0 e 76,5 ng kg^{-1} para ENR e de 22,6 ng kg^{-1} para NOR. A administração de FQs para frango de corte contaminou corpos hídricos adjacentes aos galpões de produção.

Referências

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere,** Oxford, v. 50, n. 10, p. 1319-1330, Mar 2003.

BENGTSSON-PALME, J.; BOULUND, F.; FICK, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D.G.J Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 14, Dec 2014.

BOXALL, A.B.A.; KOLPIN, D.W.; HALLING-SORENSEN, B.; TOLLS, J. Are veterinary medicines causing environmental risks? **Environmental Science &Technology,** Easton, v.37, p.286-294, Aug 2003.

CABELLO, F. C. Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. **Environmental Microbiology,** Oxford, v. 8, n. 7, p. 1137-1144, Jul 2006.

COLOMER-LLUCH, M.; CALERO-CACERES, W.; JEBRI, S.; HMAIED, F.; MUNIESA, M.; JOFRE, J. Antibiotic resistance genes in bacterial and bacteriophage fractions of Tunisian and Spanish wastewaters as markers to compare the antibiotic resistance patterns in each population. **Environment International,** Elmsford, v. 73, p. 167-175, Dec 2014.

CORDOVA-KREYLOS, A. L.; SCOW, K. M. Effects of ciprofloxacin on salt marsh sediment microbial communities. **ISME Journal**, London, v. 1, n. 7, p. 585-595, Nov 2007.

FICK, J.; SODERSTROM, H.; LINDBERG, R.H.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D.G.J. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, Dec 2009.

FIGUEROA, R. A.; LEONARD, A.; MACKAY, A. A. Modeling tetracycline antibiotic sorption to clays. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 38, n. 2, p. 476-483, Jan 2004.

FOCAZIO, M.J.; KOLPIN, D.W.; BARNES, K.K.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; THURMAN, M.E. A national reconnaissance for pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States - II) Untreated drinking water sources, **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 402, n. 2-3, p. 201-216, Sep 2008.

GAO, J. A.; PEDERSEN, J. A. Adsorption of sulfonamide antimicrobial agents to clay minerals. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 39, n. 24, p. 9509-9516, Dec 2005.

GIGER, W.; ALDER, A.C.; GOLET, E.M.; KOHLER, H.P.E.; MCARDELL, C.S.; MOLNAR, E.; SIEGRIST, H.; SUTER, M.J.F. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. **Chimia**, Zurich, v. 57, n. 9, p. 485-491, 2003.

GOLET, E.M.; STREHLER, A.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v. 74, n. 21, p. 5455-5462, Nov 2002.

GRACIA-LOR, E.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F. Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** New York, v. 1218, n. 16, p. 2264-2275, Apr 2011.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELO, D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. **Talanta,** London, v. 70, n. 4, p. 678-690, Nov 2006.

GUILLEN, D.; GINEBREDA, A.; FARRE, M.; DARBRA, R.M.; PETROVIC, M.; GROS, M.; BARCELO, D. Prioritization of chemicals in the aquatic environment based on risk assessment: Analytical, modeling and regulatory perspective. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 440, p. 236-252, Dec 2012.

HALLING-SORENSEN, B.; SENGELOV, G.; TJORNELUND, J. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmentally relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** New York, v. 42, n. 3, p. 263-271, Apr 2002.

HARI, A.C.; PARUCHURI, R.A.; SABATINI, D.A.; KIBBEY, T.C.G.Effects of pH and cationic and nonionic surfactants on the adsorption of pharmaceuticals to a natural aquifer material. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 39, n. 8, p. 2592-2598, Apr 2005.

HARTMANN, A.; ALDER, A.C.; KOLLER, T.; WIDMER, R.M. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. **Environmental Toxicology and Chemistry,** New York, v. 17, n. 3, p. 377-382, Mar 1998.

HE, K.; BLANEY, L. Systematic optimization of an SPE with HPLC-FLD method for fluoroquinolone detection in wastewater. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 282, p. 96-105, Jan 2015.

HERRERA-HERRERA, A. V.; HERNANDEZ-BORGES, J.; RODRIGUEZ-DELGADO, M. A. Ionic liquids as mobile phase additives for the high-performance liquid chromatographic analysis of fluoroquinolone antibiotics in water samples. **Analytical and BioAnalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 392, n. 7-8, p. 1439-1446, Dec 2008.

ISABEL CARRETERO, M.; POZO, M. Clay and non-clay minerals in the pharmaceutical industry Part I. Excipients and medical applications. **Applied Clay Science,** Amsterdam, v. 46, n. 1, p. 73-80, Sep 2009.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Response to comment on "pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance". **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, n. 5, p. 1054-1054, Mar 2003.

LAI, H.T.; LIN, J.J. Degradation of oxolinic acid and flumequine in aquaculture pond waters and sediments. **Chemosphere,** Oxford, v. 75, n. 4, p. 462-468, Apr 2009.

LEE, H.B.; PEART, T.E.; SVOBODA, M.L. Determination of ofloxacin, norfloxacin, and ciprofloxacin in sewage by selective solid-phase extraction, liquid chromatography with fluorescence detection, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A,** New York, v. 1139, n. 1, p. 45-52, Jan 2007.

LI, Y.; NIU, J.; WANG, W. Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. **Chemosphere,** Oxford, v. 85, n. 5, p. 892-897, Oct 2011.

LIN, C.E.; DENG, Y.J.; LIAO, W.S.; SUN, S.W.; LIN, W.Y.; CHEN, C.C. Electrophoretic behavior and pK(a) determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A,** New York, v. 1051, n. 1-2, p. 283-290, Oct 2004.

LÓPEZ-SERNA, R.; POSTIGO, C.; BLANCO, J.; PÉREZ, S.; GINEBREDA, A.; LÓPEZ DE ALDA, M. Assessing the effects of tertiary treated wastewater reuse on the presence emerging contaminants in a Mediterranean river (Llobregat, NE Spain). **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v.19, p.1000-1012, May 2012.

MADUREIRA, T.V.; BARREIRO, J.C.; ROCHA, M.J.; ROCHA, E.; CASS, Q.B.; TIRITAN, M.E Spatiotemporal distribution of pharmaceuticals in the Douro River estuary (Portugal). **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 408, n. 22, p. 5513-5520, Oct 2010.

MAMANI, M.C.V. **Desenvolvimento e validação de métodos para a determinação de antimicrobianos em leite e fármacos usando a cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.** 2007. 208 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

MARTINEZ, J.L. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. **Environmental Pollution**, London, v.157, p.2893–2902, Nov 2009.

MASSMANN, G.; SUELTENFUSS, J.; DUENNBIER, U.; KNAPPE, A.; TAUTE, T.; PEKDEGER, A. Investigation of groundwater a residence times during bank filtration in Berlin: multi-tracer approach. **Hydrological Processes,** Chichester, v. 22, n. 6, p. 788-801, Mar 2008.

MIAO, X.S.; BISHAY, F.; CHEN, M.; METCALFE, C.D. Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 38, n. 13, p. 3533-3541, Jul 2004.

MONTEIRO, S.H. **Ocorrência de antibióticos e estudo de resistência microbiana em sistemas aquaculturais do Rio Paraná, reservatório de Ilha Solteira, na região de Santa Fé do Sul, estado de São Paulo.** 2014. 111 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

NOWARA, A.; BURHENNE, J.; SPITELLER, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, DC, v.45, p.1459-1463, Apr 1997.

PICO, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil - risks and challenges. **Analytical and BioAnalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, Feb 2007.

RICO, A.; OLIVEIRA, R.; MCDONOUGH, S.; MATSER, A.; KHATIKARN, J.; SATAPORNVANIT, K.; NOGUEIRA, A.J.A.; SOARES, A.M.V.M.; DOMINGUES, I.; VAN DEN BRINK, P.J. Use, fate and ecological risks of antibiotics applied in tilapia cage farming in Thailand. **Environmental Pollution,** London, v. 191, p. 8-16, Aug 2014.

RIZZO, L.; MANAIA, C.; MERLIN, C.; SCHWARTZ, T.; DAGOT, C.; PLOY, M.C.; MICHAEL, I.; FATTA-KASSINOS, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 447, p. 345-360, Mar 1 2013.

RUTGERSSON, C., FICK, J., MARATHE, N., KRISTIANSSON, E., JANZON, A., ANGELIN, M., JOHANSSON, A., SHOUCHE, Y., FLACH, C.F., LARSSON, D.G.J. Fluoroquinolones and qnr Genes in Sediment, Water, Soil, and Human Fecal Flora in an Environment Polluted by Manufacturing Discharges. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 48, n. 14, p. 7825-7832, Jul 2014.

SEIFRTOVA, M.; PENA, A.; LINO, C.M.; SOLICH, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in hospital and municipal wastewaters in Coimbra by liquid chromatography with a monolithic column and fluorescence detection. **Analytical and BioAnalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 391, n. 3, p. 799-805, Jun 2008.

SILVA, F. A. S.; AZEVEDO, C. A. V. Principal components analysis in the software Assistat - Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, Reno, NV. St. Joseph: ASABE, 2009.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, Sep 2011.

SUMPRADIT, N.; CHONGTRAKUL, P.; ANUWONG, K.; PUMTONG, S.; KONGSOMBOON, K.; BUTDEEMEE, P.; KHONGLORMYATI, J.; CHOMYONG, S.; TONGYOUNG, P.; LOSIRIWAT, S.; SEESUK, P.; SUWANWAREE, P.; TANGCHAROENSATHIEN, V. Antibiotics Smart Use: a workable model for promoting the rational use of medicines in Thailand. **Bulletin of the World Health Organization,** Geneve, v. 90, n. 12, p. 905-913, Dec 2012.

SUZUKI, S.; HORA, P.T.P. Distribution of quinolones, sulfonamides, tetracyclines in aquatic environment and antibiotic resistance in Indochina. **Frontiers in Microbiology,** Lausanne, v. 3, n. 67, p. 1 -8, Feb 2012.

TEIJON, G., CANDELA, L., TAMOH, K., MOLINA-DIAZ, A., FERNANDEZ-ALBA, A.R. Occurrence of emerging contaminants, priority substances (2008/105/CE) and heavy metals in treated wastewater and groundwater at Depurbaix facility (Barcelona, Spain). **Science of the Total Environmen**t, Amsterdam, v. 408, n. 17, p. 3584-3595, Aug 2010.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, Sep 1 2001.

TONG, C.; ZHUO, X.; GUO, Y. Occurrence and Risk Assessment of Four Typical Fluoroquinolone Antibiotics in Raw and Treated Sewage and in Receiving Waters in Hangzhou, China. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** Washington, DC, v. 59, n. 13, p. 7303-7309, Jul 2011.

VAN DOORSLAER, X.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 500, p. 250-269, Dec 2014.

VAZQUEZ-ROIG, P.; ANDREU, V.; BLASCO, C.; PICO, Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 440, p. 24-32, Dec 2012.

VELICU, M.; SURI, R. Presence of steroid hormones and antibiotics in surface water of agricultural, suburban and mixed-use areas. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 154, n. 1-4, p. 349-359, Jul 2009.

WAN, M.; LI, Z.; HONG, H.; WU, Q. Enrofloxacin uptake and retention on different types of clays. **Journal of Asian Earth Sciences,** Oxford, v. 77, p. 287-294, Nov 2013.

WEBB, S.; TERNES, T.; GIBERT, M.; OLEJNICZAK, K Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water.**Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 142, n. 3, p. 157-167, May 2003.

WU, Q.; LI, Z.; HONG, H.; YIN, K.; TIE, L. Adsorption and intercalation of ciprofloxacin on montmorillonite. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 50, p. 204-211, Oct 2010.

XU, W.H.; ZHANG, G.; WAI, O.W.H.; ZOU, S.C.; LI, X.D. Transport and adsorption of antibiotics by marine sediments in a dynamic environment. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v. 9, n. 4, p. 364-373, Aug 2009.

YANG, J.F.; YING, G.G.; ZHAO, J.L.; TAO, R.; SU, H.C.; CHEN, F. Simultaneous determination of four classes of antibiotics in sediments of the Pearl Rivers using RRLC-MS/MS. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 408, n. 16, p. 3424-3432, Jul 2010.

YIRUHAN; WANG, Q.-J.; MO, C.-H.; LI, Y.-W.; GAO, P.; TAI, Y.-P.; ZHANG, Y.; RUAN, Z.-L.; XU, J.-W. Determination of four fluoroquinolone antibiotics in tap water in Guangzhou and Macao. **Environmental Pollution,** London, v. 158, n. 7, p. 2350-2358, Jul 2010.

ZHOU, L.J.; YING, G.G.; ZHAO, J.L.; YANG, J.F.; WANG, L.; YANG, B.; LIU, S. Trends in the occurrence of human and veterinary antibiotics in the sediments of the Yellow River, Hai River and Liao River in northern China. **Environmental Pollution,** London, v. 159, n. 7, p. 1877-1885, Jul 2011.

ZHOU, X., CHEN, C., YUE, L., SUN, Y., DING, H., LIU, Y. Excretion of enrofloxacin in pigs and its effect on ecological environment. **Environmental Toxicology and Pharmacology,** Amsterdam, v. 26, n. 3, p. 272-277, Nov 2008.

5. Estudos de toxicidade aguda de fluoroquinolonas em organismos aquáticos

Resumo

Muitas classes de fármacos veterinários têm sido detectadas em corpos hídricos devido à sua aplicação constante na produção pecuária. No entanto, ainda existem lacunas em nosso conhecimento sobre o destino e os efeitos de medicamentos no ambiente. A produção de frango de corte é uma atividade comum na região de Piracicaba/SP e antimicrobianos do grupo das fluoroquinolonas (FQs) são os compostos mais administrados aos animais. Acredita-se que esses fármacos, que atingem corpos hídricos adjacentes aos galpões de produção, possam causar toxicidade aguda aos organismos aquáticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade aguda de FQs aos organismos testes *Daphnia magna* e *Danio rerio*. Os ensaios foram conduzidos de acordo com a NBR 12713 da ABNT (2003) com os antimicrobianos norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e ciprofloxacina (CIP), todos pertencentes ao grupo das FQs. Os resultados encontrados para *D. magna* (CE_{50}-48 h) foram: 92,49 mg L^{-1} e 73,04 mg L^{-1} para ENR e NOR, respectivamente, e para *Danio rerio* a CL_{50} (96 h) foi 190,9 mg L^{-1} para ENR. Testes de toxicidade com CIP não puderam ser realizados devido a limitações de solubilidade deste composto. Concluiu-se que a ENR e a NOR são pouco tóxicas aos organismos testados, pois os valores de CE_{50}/CL_{50} foram muito elevados (mg L^{-1}) e não condizentes com condições reais de campo. Dificilmente ocorrerá toxicidade aguda para *Daphnia magna* e *Danio rerio* em ambiente natural.

Palavras-chave: Antimicrobianos. *Daphnia magna. Danio rerio.*

Abstract

Many classes of veterinary antibiotics have been detected in water bodies because of its constant application in livestock production. However, there are still gaps in our knowledge about the fate and effects of antibiotics in the environment. The broiler production is a common activity in Piracicaba/SP region and fluoroquinolones (FQs) are the most antimicrobial administered to the animals. It is believed that these medicines reach in water bodies near sheds production and can cause acute toxicity to aquatic organisms. The objective of this study was to evaluate the acute toxicity of FQs to *Daphnia magna* and *Danio rerio*. Tests were conducted according to NBR 12713 of ABNT (2003) with norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP), all belonging to FQs group. The acute toxicity values for *D. magna* (CE_{50}-48 h) were 92.49 mg L^{-1} and 73.04 mg L^{-1} for ENR and NOR, respectively, and for *D. rerio* LC_{50} (96h) was 190.9 mg L^{-1} for ENR. Toxicity tests with CIP could not be performed because of solubility limitations with this compound. It was concluded that ENR and NOR have low toxicity to the organisms tested because of EC_{50}/LC_{50} values were very high (mg L^{-1}) and not consistent with actual field conditions. It will be difficult to occur acute toxicity to *Daphnia magna* and *Danio rerio* in natural environment.

Keywords: Antimicrobials. *Daphnia magna. Danio rerio.*

5.1 Introdução

O consumo de FQs em medicina veterinária aumenta a cada ano. Entre os diferentes compostos, a ENR, a NOR e a CIP são os mais utilizados em todo o mundo. Muitos países proibiram o uso da ENR em produção de frango devido à indução de resistência bacteriana que pode atingir seres humanos (EMA, 2013). Dados da Polônia indicam que as FQs são o quinto grupo de antimicrobianos mais utilizados no país, sendo que em 2012 foram consumidos 33 toneladas desses fármacos (WAGIL et al., 2014). Por estarem presentes na maior parte dos ambientes (solo, água, sedimento) e apresentarem baixos índices de degradação, as FQs têm sido detectadas em diversos organismos, tais como peixes e mariscos (SAMANIDOU et al., 2008). Na última década, o uso de peixes como modelos para o controle de produtos químicos tóxicos em ambientes aquáticos tornou-se popular (CAVAS; ERGENE-GOZUKARA, 2003) devido a sua capacidade em metabolizar e acumular poluentes químicos, responder a baixas concentrações desses compostos e desempenhar diversas funções na cadeia trófica (BOTELHO, 2013). Entre as espécies utilizadas em ensaios de toxicidade o *Danio rerio* destaca-se, pois apresenta grande adaptabilidade, podendo sobreviver em diferentes condições ambientais e se reproduzir facilmente em ambiente artificial (GERGER et al., 2015). Testes de toxicidade com microcrustáceos também são muito comuns, principalmente com *Daphnia sp.*, pois eles são a base da cadeia alimentar, servindo como fonte de alimento para os anfíbios, peixes e outros organismos aquáticos (CONSTANTINE, HUGGETT, 2010). Acredita-se que as FQs aplicadas na produção de frango de corte que atingem os corpos hídricos adjacentes às granjas possam causar efeitos nocivos aos organismos aquáticos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial impacto desses fármacos por meio de teste de toxicidade aguda em microrganismos aquáticos (*Daphnia magna)* e em peixe (*Danio rerio).*

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Manutenção e delineamento experimental com *Daphnia magna*

Os procedimentos para manutenção e condução dos testes de toxicidade aguda foram realizados de acordo com a NBR 12713 da ABNT (2003). As culturas foram mantidas em incubadora em água reconstituída preparada com água deionizada e reagente de acordo com a ABNT (2003) a temperatura de 20º C (± 2º C), com fotoperíodo de 16 horas luz. O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecotoxicologia Aquática do Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Universidade de São Paulo (CENA/USP). O meio de cultivo foi renovado duas vezes por semana e a cultura de *D. magna* foi alimentada três vezes por semana com suspensão algácea de *Pseudokirchneriella subcapitata* (1,0 x 10^7 células organismo^{-1}) (ABNT, 2003).

Para o procedimento experimental foram estabelecidas sete concentrações de cada fármaco de interesse (NOR, ENR e CIP) com quatro repetições + grupo controle. Sete organismos com idade entre 2 e 26 horas foram adicionados em cada replicata. As concentrações utilizadas para os ensaios com NOR foram: controle; 3; 7; 15; 35; 75; 160 e 200 mg L^{-1} e para ENR: controle; 5; 30; 75; 100; 150; 200 e 300 mg L^{-1}. A CIP não solubilizou no meio de cultura utilizado no experimento, portanto foi suprimida do ensaio. Foram avaliados imobilidade e os efeitos adversos em *D. magna* 24 e 48 horas após o início dos testes. A concentração letal média (CL_{50}-48h) foi determinada após 48 horas de exposição dos microrganismos aos fármacos.

Teste de Referência

Foi conduzido um teste de referência utilizando dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) para verificar a sensibilidade do sistema teste, usando as seguintes concentrações: controle; 0,32; 0,56; 1,00; 1,80 e 2,40 mg L^{-1}. As condições do teste foram as mesmas das mencionadas para os testes com *D. magna*.

5.2.2 Manutenção e delineamento experimental com *Danio rerio*

Antes do início dos testes adultos de *D. rerio* (aproximadamente 0,3 g) foram mantidos em um tanque com capacidade para 320 L de água de abastecimento desclorada (pH entre 7,4 e 7,8, oxigênio dissolvido entre 5,0 e 7,0 mg L^{-1} e dureza entre 60 e 120 mg L^{-1} $CaCO_3$) com aeração contínua durante 10 dias para aclimatação. Durante este período os peixes foram alimentados duas vezes ao dia com ração para peixes.

Os testes de toxicidade foram baseados no Guideline 202 da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 1992). Para o procedimento experimental foram estabelecidas cinco concentrações de cada fármaco de interesse (NOR, ENR e CIP) com duas repetições + grupo controle (água de manutenção), com sete organismos cada. O experimento foi realizado em béqueres de 2 L com aeração contínua. As concentrações utilizadas para os ensaios com ENR foram: controle; 130; 150; 170; 200 e 220 mg L^{-1}. Os fármacos NOR e CIP apresentaram baixa solubilidade, sendo suprimidos dos testes. Todos os tratamentos foram preparados utilizando-se a mesma água que os peixes foram mantidos. A duração do teste foi de 96 horas em sistema estático e após o período de exposição foi determinada a concentração de fármaco que causa 50% de letalidade (CL_{50}-96h) aos organismos testados.

Teste de Referência

O teste de referência com o $K_2Cr_2O_7$ foi conduzido com as seguintes concentrações: controle; 100, 180, 320 e 560 mg L^{-1}. As condições do teste foram iguais às mencionadas para os testes com *D. rerio*.

5.2.3 Análise Estatística

A CE_{50}/CL_{50} com limite de confiança de 95% ($LC_{95\%}$) foram obtidos utilizando-se o método Trimmed Spearman- Karber (HAMILTON et al., 1977) tanto para os testes com *D. magna* quanto para *D. rerio*.

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1. Testes de toxicidade aguda em *Daphnia magna*

A CE_{50} (48 h) para ENR foi 92,49 mg L^{-1} ($LC_{95\%}$ = 67,68 a 126,41 mg L^{-1}) e a primeira concentração que causou 100% de imobilidade foi 300 mg L^{-1}. Já para NOR, a CE_{50} (48 h) foi 73,04 mg L^{-1} ($LC_{95\%}$= 58,63 a 90,98 mg L^{-1}) e a primeira concentração que causou 100% de imobilidade foi de 200 mg L^{-1}. Com esses resultados observou-se que, comparativamente, a NOR apresentou maior toxicidade que a ENR. O experimento não permitiu efetuar o mesmo teste com CIP devido a solubilidade em meio, mesmo após a adição de solvente orgânico (acetona).

Como foi discutido no capítulo 4, não foram detectados NOR, ENR e CIP em águas superficiais, portanto não ocorre toxicidade aguda para *D. magna* nas granjas selecionadas. No entanto muitos trabalhos mencionaram a presença desses fármacos no ecossistema aquático, conforme foi discutido anteriormente, com concentrações em áreas de pecuária na faixa de ng L^{-1} ou µg L^{-1} (KOLPIN et al., 2003, CARLSSON et al., 2009; KWON et al., 2009; BARTOSKOVA et al., 2014). As concentrações desses fármacos em condições naturais são de mil a um milhão de vezes menores do que a relação dose-resposta entre FQs e mortalidade em *D. magna* obtidas neste trabalho. Apesar da presença de FQs em sedimento, este não apresentou potencial de contaminação pela sua ausência em água superficial.

Vários autores encontraram valores de CE_{50} para *D. magna* semelhantes aos estimados neste trabalho, todos na ordem de mg L^{-1}. Estudos realizados na Espanha encontraram valores de CE_{50} de 1,5 mg L^{-1} e 1,0 mg L^{-1} para NOR e CIP, respectivamente (SANDERSON et al., 2003). Na China foram encontrados valores de CE_{50} de 187,48 mg L^{-1} para NOR (LU et al., 2013) e CE_{50} de 56,7 mg L^{-1} para ENR (KIM et al., 2007). Já na Coréia do Sul foram relatados valores de CE_{50} entre 11,47 e 58,5 mg L^{-1} para ENR (PARK; CHOI, 2008; KIM et al., 2010). Todos esses pesquisadores analisaram a relação dose-resposta entre FQs e *D. magna* no período de 48 horas. Alguns estudos de toxicidade aguda realizados no Brasil, em condições de laboratório, encontraram valores de CE_{50} para este microcrustáceo de 39,41 e 54,36 mg L^{-1} para NOR e ENR, respectivamente (SOUSA, 2013; TORRES, 2014).

Relatos de literatura indicaram que as FQs apresentam baixa toxicidade sobre *D. magna* (SOUSA, 2013; TORRES, 2014). Alguns autores sugerem que a persistência desses compostos no ambiente, mesmo em concentrações mais baixas, possa induzir efeitos tóxicos em organismos aquáticos ao longo do tempo (ROBINSON et al., 2005; VAN DOORSLAER et al., 2014). Testes de toxicidade aguda com CIP em *Daphnia magna* obtiveram CE_{50} = 65,3 mg L^{-1}, nível mais elevado do que as concentrações ambientais (MARTINS et al., 2012). Esses autores afirmaram que a *Pseudokirchneriella subcapita*, microalga usada como bioindicador de poluição ambiental, foi mais sensível (EC_{50} = 3,9 mg L^{-1}) sob exposição de curto prazo à CIP do que *D. magna*, mas a longo prazo foram observados efeitos crônicos negativos sobre o tamanho dos recém-nascidos, a fecundidade, o número de ninhadas por fêmea e a idade da primeira reprodução desse microcrustáceo. Tais resultados podem antecipar-se aos danos potenciais que a exposição contínua a fármacos possam causar sobre a manutenção da comunidade natural (MARTINS, et al., 2012).

O tamanho reduzido de neonatos pode restringir a capacidade dos organismos recém-nascidos de resistir a condições prejudiciais e garantir o equilíbrio populacional (STIBOR,

LAMPERT, 1993). Não foi possível detectar a concentração de CIP que cause toxicidade crônica em *D. magna* (MARTINS, et al., 2012), mas pesquisadores afirmam que os valores que causam efeitos deletérios geralmente são superiores aos níveis detectados nas matrizes aquáticas (PENA et al., 2007). Por este motivo vários trabalhos classificaram as FQs como pouco tóxicas para *D. magna* (HALLING-SORENSEN et al., 2000; PENA et al., 2007; MARTINS, et al., 2012; SOUSA, 2013; TORRES, 2014).

A fim de encontrarem um valor norteador da toxicidade crônica de FQs em microcrustáceos, alguns autores avaliaram a toxicidade crônica de ofloxacina, pertencente ao grupo das FQs, para o microcrustáceo teste *Ceriodaphnia dubia* e observaram redução na taxa de reprodução a partir do sétimo dia em concentrações que variaram entre 3,13 e 10 mg L^{-1} (FERRARI et al., 2004; ISIDORI et al., 2005). Ainda, considerando os níveis tróficos, os produtores são mais sensíveis às FQs que os consumidores. A ordem dos organismos mais sensíveis aos mais tolerantes foi registrada da seguinte maneira: *Lemma minor* (macrófita) > *P. subcapitata* (algas) > *Vibrio fischeri* (bactéria marinha) > *D. magna* (microcrustáceo) > *Gambusia holbrooki* (pequeno peixe de água doce) (MARTINS, et al., 2012). Esses autores consideraram a CIP fitotóxica devido aos seus efeitos sobre os produtores, moderamente tóxica para *D. magna* e não tóxica para *G. holbrooki*.

5.3.2 Testes de toxicidade aguda em *Danio rerio*

Neste estudo avaliou-se a CL_{50} (96 h), que é a concentração que causa morte para 50% dos organismos teste em um período de 96 horas de exposição. A CL_{50} (96 h) para ENR foi 190,9 mg L^{-1} ($LC_{95\%}$ = 179,53 a 203 mg L^{-1}).

Não foi possível definir a concentração letal de NOR e CIP para *D. rerio* neste estudo. Foram realizados testes até a concentração de 300 mg L^{-1} para NOR, mas não houve a morte do organismo teste. Seria necessário testar níveis mais elevados desse fármaco, fato que não foi possível devido aos problemas de solubilidade em água, mesmo com a adição de solvente orgânico (acetona) (Figura 5.1). Além disso, os testes tornam-se inviáveis, pois não se encontra concentrações tão elevadas de FQs em matrizes ambientais. Já para a CIP, houve solubilização até 100 mg L^{-1}, mas nesta concentração também não houve morte do organismo teste. Mesmo assim foi possível observar que antes de completar 96 h de teste houve precipitação da CIP no meio (Figura 5.2).

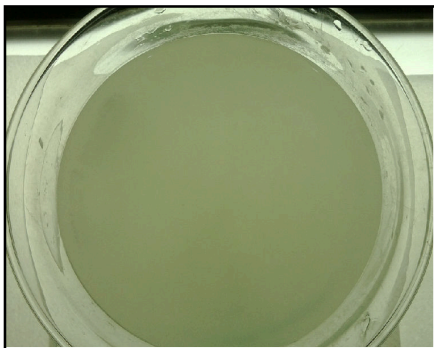


Figura 5.1 - Solubilização de NOR em testes com 300 mg L^{-1}.

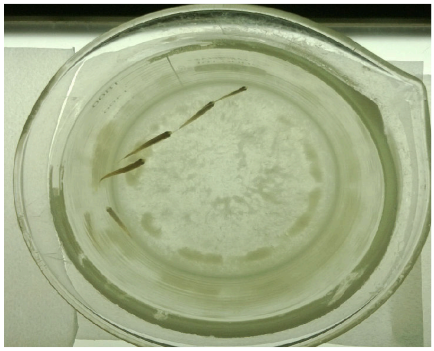


Figura 5.2 - Precipitação de CIP no meio experimental (100 mg L^{-1}).

Uma visão geral dos testes de toxicidade aguda com *Danio rerio* mostra os problemas de solubilidade com as moléculas CIP e NOR (Figura 5.3).

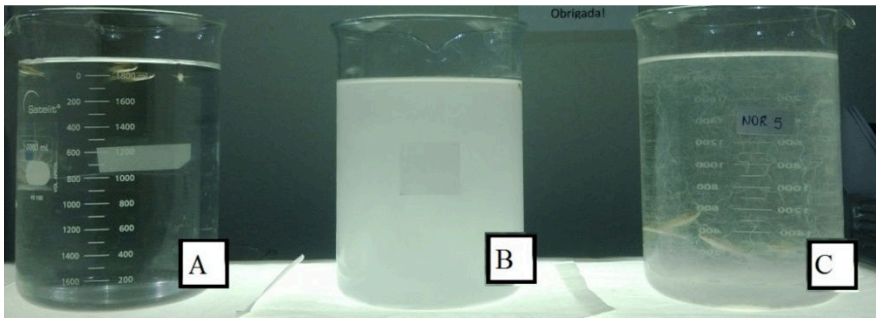


Figura 5.3 - Testes preliminares de toxicidade aguda em *D. rerio*. A - ENR (300 mg L^{-1}), B - CIP (100 mg L^{-1}) e C - NOR (300 mg L^{-1}).

Outros autores também encontraram problemas com a solubilidade de FQs inviabilizando experimentos (CARLSSON et al., 2013; TORRES, 2014). Em um trabalho realizado na Suécia com o objetivo de avaliar os efeitos tóxicos de 15 fármacos veterinários em embriões do *D. rerio*, foram observados problemas com a solubilidade da ENR e da danofloxacina, impedindo a execução de testes de toxicidade com esses fármacos (CARLSSON et al., 2013).

Assim como foi discutido anteriormente para o organismo teste *Daphnia magna*, a concentração observada para a ENR neste estudo, CL_{50} = 190,9 mg L^{-1}, foi muito acima dos valores encontrados em condições naturais normais. Esses valores dificilmente serão encontrados no ambiente aquático, mesmo em casos de contaminação dessa matriz (HARTMANN et al., 1998; ANDREOZZI et al., 2003; FICK et al., 2009).

Os dados deste estudo corroboram com os encontrados por Martins et al., (2012), que não observaram toxicidade aguda para peixes (*G. holbrooki*) submetidos a doses crescentes de

CIP. Outros autores também não encontraram diferenças nas taxas de crescimento de *D. rerio* quando estes foram expostos a concentrações de NOR que variaram entre 0,1 e 30 mg L^{-1} (BARTOSKOVA et al., 2014). No entanto, foi observado aumento na atividade das enzimas antioxidantes catalase e glutationa peroxidase nos peixes, principalmente na dose de 30 mg L^{-1} de NOR. Essas enzimas fazem parte do sistema de defesa enzimático celular (LI et al., 2011). Os pesquisadores enfatizam que em condições ambientais naturais esses efeitos não foram observados, pois a concentração de NOR não superou 0,1 μg L^{-1} (BARTOSKOVA et al., 2014). Halling-Sorensen et al. (2000) não registraram nenhum efeito adverso em *D. rerio* expostos a 100 mg L^{-1} de CIP durante 72 h. Outros autores concordam com o exposto, pois não encontraram efeitos adversos em organismos aquáticos expostos a efluentes contendo até 10 mg L^{-1} de CIP, ENR, lomefloxacina e ofloxacina, todas pertencentes ao grupo das FQs (LARSSON, PAXEUS, 2007).

O maior desafio hoje é identificar os componentes de efluentes que causam efeitos nocivos a organismos aquáticos e estabelecer medidas adequadas para reduzir o impacto ambiental. Verificou-se que os efeitos de ENR e NOR, nestes organismos, são pouco expressivos.

5.4. Conclusões

As concentrações de CE_{50}/CL_{50} para ENR e NOR determinadas nesse estudo não são compatíveis com as encontradas em campo.

Referências

ANDREOZZI, R.; MAROTTA, R.; PAXEUS, N. Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment. **Chemosphere,** Oxford, v. 50, n. 10, p. 1319-1330, Mar 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Ecotoxicologia aquática –** Toxicidade aguda – Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea – Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2003.

BARTOSKOVA, M.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; PANA, O.; ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P. Norfloxacin-toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters. **Biomed Research International**, New York, Mar 2014.

BOTELHO, R.G. **Avaliação da qualidade da água do rio Piracicaba (SP) e feito da vinhaça para organismos aquáticos antes e após a correção do pH.** 107 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

CARLSSON, G., PATRING, J., KREUGER, J., NORRGREN, L., OSKARSSON, A. Toxicity of 15 veterinary pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Aquatic Toxicology,** Amsterdam, v. 126, p. 30-41, Jan 2013.

CARLSSON, G.; ORN, S.; LARSSON, D. G. J. Effluent from bulk drug production is toxic to aquatic vertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 12, p. 2656-2662, Dec 2009.

CAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Micronuclei, nuclear lesions and interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) as cyto-genotoxicity indicators in Oreochromis niloticus exposed to textile mill effluent. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 538, n. 1-2, p. 81-91, Jul 8 2003.

CONSTANTINE, L.A.; HUGGETT, D.B.A Comparison of the chronic effects of human pharmaceuticals on two cladocerans, *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemosphere,** Oxford, v. 80, n. 9, p. 1069-1074, Aug 2010.

EMA **Sales of veterinary antimicrobial agents in 25 EU/EEA countries in 2011. EMA/236501/2013.** Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500152311.pdf>. Acesso em 11 mar 2015.

FERRARI, B.; MONS, R.; VOLLAT, B.; FRAYSSE, B.; PAXEUS, N.; LO GIUDICE, R.; POLLIO, A.; GARRIC, J. Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 23, n. 5, p. 1344-1354, May 2004.

FICK, J.; SODERSTROM, H.; LINDBERG, R.H.; PHAN, C.; TYSKLIND, M.; LARSSON, D.G.J. Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 28, n. 12, p. 2522-2527, Dec 2009.

GERGER, C.J.; THOMAS, J.K.; JANZ, D.M.; WEBER, L.P. Acute effects of beta-naphthoflavone on cardiorespiratory function and metabolism in adult zebrafish (*Danio rerio*). **Fish Physiology and Biochemistry,** Amsterdam, v. 41, n. 1, p. 289-298, Feb 2015.

HALLING-SORENSEN, B.; LUTZHOFT, H.C.H.; ANDERSEN, H.R.; INGERSLEV, F. Environmental risk assessment of antibiotics: comparison of mecillinam, trimethoprim and ciprofloxacin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy,** London, v. 46, p. 53-58, Sep 2000.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed spearman-karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HARTMANN, A.; ALDER, A.C.; KOLLER, T.; WIDMER, R.M. Identification of fluoroquinolone antibiotics as the main source of umuC genotoxicity in native hospital wastewater. **Environmental Toxicology and Chemistry,** New York, v. 17, n. 3, p. 377-382, Mar 1998.

ISIDORI, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PASCARELLA, L.; PARRELLA, A. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 346, n. 1-3, p. 87-98, Jun 2005.

KIM, J.; PARK, J.; KIM, P.-G.; LEE, C.; CHOI, K.; CHOI, K. Implication of global environmental changes on chemical toxicity-effect of water temperature, pH, and ultraviolet B irradiation on acute toxicity of several pharmaceuticals in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology,** London, v. 19, n. 4, p. 662-669, Apr 2010.

KIM, S.D.; CHO, J.; KIM, I.S.; VANDERFORD, B.J.; SNYDER, S.A. Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters. **Water Research,** Oxford, v. 41, n. 5, p. 1013-1021, Mar 2007.

KNOW, J.W.; ARMBRUST, K.L.; VIDAL-DORSCH, D.; BAY, S.M. Determination of 17alpha-ethynylestradiol, carbamazepine, diazepam, simvastatin and oxybenzone in fish livers. **Journal of AOAC International,** Arlington, v. 92, p. 359-369, Jan-Feb 2009.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M.; ZAUGG, S.D.; BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Response to comment on "pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000: A national reconnaissance". **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, n. 5, p. 1054-1054, Mar 2003.

LARSSON, D.G.J.; DE PEDRO, C.; PAXEUS, N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. **Journal of Hazardous Materials,** Amsterdam, v. 148, n. 3, p. 751-755, Sep 2007.

LI, Y.; NIU, J.; WANG, W. Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products. **Chemosphere,** Oxford, v. 85, n. 5, p. 892-897, Oct 2011.

LU, G.; LI, Z.; LIU, J. Effects of selected pharmaceuticals on growth, reproduction and feeding of *Daphnia magna*. **Fresenius Environmental Bulletin,** Basel, v. 22, n. 9, p. 2583-2589, Oct 2013.

MARTINS, N.; PEREIRA, R.; ABRANTES, N.; PEREIRA, J.; GONCALVES, F.; MARQUES, C.R. Ecotoxicological effects of ciprofloxacin on freshwater species: data integration and derivation of toxicity thresholds for risk assessment. **Ecotoxicology**, London, v. 21, n. 4, p. 1167-1176, May 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guideline 203 – Guideline for testing of chemicals**: fish, acute toxicity test; effects on biotic systems. Paris, 1992.

PARK, S.; CHOI, K. Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. **Ecotoxicology**, London, v. 17, n. 6, p. 526-538, Aug 2008.

PENA, A.; CHMIELOVA, D.; LINO, C.M.; SOLICH, P. Determination of fluoroquinolone antibiotics in surface waters from Mondego river by high performance liquid chromatography using a monolithic column. **Journal of Separation Science**, Hoboken, v. 30, p. 2924-2928, Nov 2007.

ROBINSON, A. A.; BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Toxicity of fluoroquinolone antibiotics to aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry,** New York, v. 24, n. 2, p. 423-430, Feb 2005.

SAMANIDOU, V., EVAGGELOPOULOU, E., TROETZMUELLER, M., GUO, X., LANKMAYR, E. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1203, n. 2, p. 115-123, Sep 2008.

SANDERSON, H.; JOHNSON, D.J.; WILSON, C.J.; BRAIN, R.A.; SOLOMON, K.R. Probabilistic hazard assessment of environmentally occurring pharmaceuticals toxicity to fish, daphnids and algae by ECOSAR screening. **Toxicology Letters,** Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 383-395, Oct 2003.

SOUSA, B.A.I. **Avaliação toxicológica de misturas dos medicamentos veterinários (monensina, sulfametazina e enrofloxacina) em *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea).** 2013. 64 f. Dissertação (Mestre em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

STIBOR, H.; LAMPERT, W. Estimating the size at maturity in-field populations of *Daphnia* (Cladocera). **Freshwater Biology,** Oxford, v. 30, n. 3, p. 433-438, Dec 1993.

TORRES, N.H. **Determinação de hormônios e antimicrobianos no Rio Piracicaba e testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna*.** 100 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

VAN DOORSLAER, X.; DEWULF, J.; VAN LANGENHOVE, H.; DEMEESTERE, K. Fluoroquinolone antibiotics: An emerging class of environmental micropollutants. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 500, p. 250-269, Dec 2014.

WAGIL, M., KUMIRSKA, J., STOLTE, S., PUCKOWSKI, A., MASZKOWSKA, J., STEPNOWSKI, P., BIALK-BIELINSKA, A. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 493, p. 1006-1013, Sep 2014.

6. Lixiviação de fluoroquinolonas em solos de granjas produtoras de frango de corte

Resumo

As fluoroquinolonas (FQs) são fármacos antimicrobianos de amplo espectro, comumente utilizados na produção de frango de corte no tratamento e prevenção de infecções urinária e respiratória e diarréia bacteriana. No entanto, esses fármacos atingem indiretamente o ambiente e causam contaminação nos solos e águas subsuperficiais por meio da lixiviação. O objetivo deste trabalho foi quantificar três moléculas de FQs, previamente detectadas no ambiente de produção de frango de corte na região de Piracicaba/SP: norfloxacina (NOR), enrofloxacina (ENR) e ciprofloxacina (CIP), que é o principal metabólito da ENR, e realizar estudos de lixiviação *in loco* através da análise da solução extraída e solos. Foram realizadas coletas em dois locais distintos dentro de seis granjas: 1) próximo ao barracão, onde foram instalados extratores de solução de cápsula porosa de 20, 40 e 60 cm de profundidade e 2) em uma granja, em um local distante do galpão de produção, onde foi instalado um poço piezométrico de 4 m de profundidade. As amostras de solo coletadas durante a instalação dos extratores de solução (0 a 60 cm de profundidade) foram analisadas pela técnica de cromatografia em fase líquida com detector de arranjo de diodos/ultravioleta (HPLC-DAD/UV) enquanto as análises das amostras de solo coletadas até 4 m de profundidade (poço piezométrico) e de água subsuperficial foram realizadas por um método de extração em fase sólida acoplado à cromatografia líquida e espectrometria de massas em tandem (*on-line*-SPE-LC-MS/MS). Não foi detectado nenhum fármaco em amostras de água, mas foram detectadas uma ou mais FQs em amostras de solo. Assim, conclui-se que houve lixiviação de FQs em campo até a profundidade estudada de 4 m e que ao analisar apenas amostras de água é provável obter conclusões falso-negativas.

Palavras-chave: Contaminação. Fármacos veterinários. Solo. Água.

Abstract

The application of fluoroquinolones (FQs) in broiler production is a common practice among producers as a preventive/curative measure, since these antibiotics have broad-spectrum in treatments of urinary and respiratory infections and in bacterial diarrhea. However, these antibiotics eventually reach the environment and can cause indirectly contamination in soil and subsurface waters through leaching. The objective of this study was to quantify three molecules of FQs, previously detected during broiler production in Piracicaba/SP region: norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR) and ciprofloxacin (CIP), which is the main metabolite of ENR, and conduct leaching studies in situ by analyzing the extracted solution from soil and soils. Samples were collected in two different sites in farms: 1) next to the shed, where porous cup solutions extractors were installed in 20, 40 and 60 cm deep (six farms) and 2) in a location far away from the production area, where it was installed a piezometric well up to 4 m deep (one farm). Soil samples were collected during the installation of the solution extractors (0 to 60 cm depth) and they were analyzed by high performance liquid chromatography-diode array/ultraviolet detector (HPLC-DAD/UV). The analysis of soil samples collected up to 4 m deep (piezometric well) and subsurface water were performed using an online solid phase extraction liquid chromatography tandem mass spectrometry method (on-line SPE-LC-MS/MS). No antibiotic in water samples has been detected, but there were one or more FQs in soil samples. So, it was concluded that there were FQs leaching in the field to the 4 m depth and when analyzing only water samples it is possible to obtain false-negative conclusions.

Keywords: Contamination. Veterinary pharmaceuticals. Soil. Water.

6.1 Introdução

A produção de frango de corte é uma das atividades pecuárias mais importantes da região de Piracicaba/SP e a aplicação de antimicrobianos do grupo das FQs é constante. No entanto, todo o resíduo gerado é descartado no ambiente sem cuidado prévio. Em regiões com alta densidade pecuária o uso de antimicrobianos representa risco potencial de contaminação de solos, águas subsuperficiais e lençol freático (OSTERMANN, et al., 2014).

O solo é um componente essencial do ambiente, mas sua importância geralmente é desconsiderada e pouco valorizada (MUGGLER et al., 2006). Um grande número de experimentos de lixiviação documentou a mobilidade de várias classes de antimicrobianos no solo (BOXALL et al., 2002; GOLET et al., 2003; KAY et al., 2005; OSTERMANN et al. 2014) e constatou contaminação em águas subterrâneas e potável (HIRSCH et al., 1999; TONG et al., 2009; HU et al., 2010). Sabe-se que as FQs sofrem adsorção em superfícies minerais carregadas, tornando-as persistentes no ambiente (CARRASQUILLO et al., 2008), causando diminuição em sua biodisponibilidade, reduzindo sua velocidade de biodegradação. Em solos ácidos há predominância da forma catiônica de FQs, uma vez que esses compostos são anfóteros (GU, KARTHIJEYAN, 2005). No entanto, em solos brasileiros, geralmente ácidos, associados à baixa capacidade de retenção de cátions, se espera uma lixiviação destes compostos e, consequentemente, um potencial de contaminação dos recursos hídricos subsuperficiais.

Há uma necessidade de se investigar o comportamento destes compostos em condições típicas de solos tropicais com estudos em campo, uma vez que os testes laboratoriais de lixiviação geralmente utilizam concentrações superiores às encontradas normalmente. Este estudo abordará a determinação de NOR, ENR e CIP em solos e água subsuperficial extraída por meio de extratores de cápsulas porosas em diferentes profundidades e em um poço piezométrico.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Extratores de solução com cápsula porosa

Coleta e análise de água e solo

Foram instalados extratores de solução com cápsula porosa com 20, 40 e 60 cm de profundidade de haste para coleta de amostras de água em seis granjas de produção de frango de corte (Piracicaba, Saltinho e Tietê/SP). Esses extratores foram instalados ao lado dos barracões de produção (Figura 6.1), de modo que receberam descarga direta de fármacos durante as lavagens dos galpões. As coletas de água foram realizadas sempre após um evento de chuva, totalizando 126 amostras durante 1 ano e 6 meses. As coletas de solos foram realizadas aos 20, 40 e 60 cm de profundidade com ajuda de um trado, no mesmo local da instalação dos extratores de solução. Após a amostragem, o solo foi colocado em um balde limpo, homogeneizado, identificado e aproximadamente 300 g foi enviado ao Laboratório Pirasolo - Laboratório Agrotécnico Piracicaba S/C Ltda para análises química: pH, MO (matéria orgânica), P (fósforo), K (potássio), Ca (cálcio), Mg (magnésio), SB (soma de bases) e CTC (capacidade de troca catiônica) e física (textura do solo).

Figura 6.1 - Extratores de solução do solo com cápsula porosa (hastes com 20, 40 e 60 cm) (à esquerda). Extratores de solução instalados em campo, ao lado do galpão de produção de frango (à direita).

As análises de amostras de água foram realizadas por *on-line*-SPE-LC-MS/MS (on-line Solid Phase Extraction Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry) e de solo por HPLC-DAD/UV (High Performance Liquid Chromatography-Diode Array/Ultraviolet Detector). As validações dos métodos analíticos foram as mesmas anteriormente descritas no capítulo 3 (análise de solo) e 4 (análise de água).

6.2.2 Poço piezométrico

Coleta e análise de água e solo

Foi instalado um poço piezométrico, em local de baixada, afastado do barracão de produção (aproximadamente 50 m), até a profundidade de 4 m em uma das granjas selecionadas (Piracicaba/SP). As coletas de água foram realizadas sempre após um evento de chuva, totalizando cinco coletas durante seis meses. As coletas de solos foram realizadas durante a instalação do poço piezométrico na superfície (20 cm), em 1, 2, 3 e 4 m de profundidade.

As análises de água e solo foram realizadas por *on-line*-SPE-LC-MS/MS. As validações dos métodos analíticos foram descritos no capítulo 4. Após a amostragem, o solo foi identificado e aproximadamente 300 g foram enviados ao Laboratório Pirasolo - Laboratório Agrotécnico Piracicaba S/C Ltda para análises química: pH, MO, P, K, Ca, Mg, SB, CTC e física (textura do solo).

6.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) utilizando o programa estatístico ASSISTAT (SILVA; AZEVEDO; 2009).

6.3 Resultados e Discussão

Detectou-se uma ou mais FQs em amostras de solo (0 a 60 cm) em todas as granjas estudadas (Tabelas 6.1, 6.2 e 6.3). A ENR foi o composto mais encontrado, provavelmente devido às taxas de administração em frangos ser maior do que de NOR. A presença de CIP é causada pela degradação da ENR, uma vez que este fármaco não pode ser administrado na produção pecuária devido a sua utilização em humanos (FINLEY et al., 2013).

Também foi detectada a ENR em solos coletados até 4 m de profundidade (Tabela 6.4). No entanto, as concentrações nessas amostras (ng kg^{-1}) foram muito menores do que as concentrações em solos amostrados até 60 cm (µg kg^{-1}), pois o local da coleta foi distante do barracão de produção onde esses fármacos foram administrados, ao contrário dos extratores de solução que foram instalados ao lado dos galpões.

Tabela 6.1 - Concentração de NOR em solos de granjas em três profundidades distintas.

Prof. (cm)	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6
	----------µg kg^{-1}----------					
0-20	12,5 ±1,3 b	12,5 ±2,4 a	56,6 ±0,7	<LD	<LD	<LD
20-40	28,3 ±1,1 a	14,9 ±0,8 a	<LD	<LD	<LD	<LD
40-60	14,9 ±2,8 b	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).
LD = limite de detecção.

Tabela 6.2 - Concentração de ENR em solos de granjas em três profundidades distintas.

Prof. (cm)	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6
	----------µg kg^{-1}----------					
0-20	35,1 ±0,6 c	32,8 ±0,5 c	<LD	<LD	33,9 ±0,1 a	<LD
20-40	46,6 ±0,5 b	93,7 ±1,4 b	<LD	<LD	29,7 ±0,6 b	27,7 ±0,9 b
40-60	57,6 ±2,9 a	105,6 ±0,7 a	<LD	<LD	<LD	37,9 ±2,7 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).
LD = limite de detecção.

Tabela 6.3 - Concentração de CIP em solos de granjas em três profundidades distintas.

Prof. (cm)	Granja 1	Granja 2	Granja 3	Granja 4	Granja 5	Granja 6
	----------µg kg^{-1}----------					
0-20	<LD	<LD	<LD	11,7 ±1,0 a	15,4 ±0,1 a	<LD
20-40	<LD	17,4 ±0,1 a	<LD	13,9 ±1,6 a	<LD	10,8 ±0,5 b
40-60	21,2 ±2,3	14,1 ±1,1 b	<LD	13,8 ±1,3 a	10,8 ±0,6 b	17,4 ±2,4 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$).
LD = limite de detecção.

Tabela 6.4 - Concentração de NOR, ENR e CIP em amostras de solo coletadas no local de instalação do poço piezométrico.

Profundidade	NOR	CIP	ENRO
	----------ng kg^{-1}----------		
0 – 0,2 m	<LD	<LD	23,03 ±1,45 c
1 m	<LD	<LD	27,53 ±1,82 b
2 m	<LD	<LD	33,88 ±1,07 a
3 m	<LD	<LD	37,15 ±0,58 a
4 m	<LD	<LD	35,49 ±1,64 a

As médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ($p < 0,05$). LD = limite de detecção.

Os resultados encontrados em solos demonstram a ocorrência de lixiviação de FQs até a profundidade de 4 m, mesmo que esses antimicrobianos apresentem forte interação com as cargas negativas do solo, o que sugere baixa mobilidade (TURIEL et al., 2006; STURINI et al., 2010). Não foram detectadas FQs nas amostras de água coletadas nos extratores de cápsula porosa e em poço piezométrico, mostrando que esses compostos se ligam às cargas do solo e não dissipam em água. Estudos de lixiviação geralmente são realizados através da solução percolada no perfil do solo (ROSOLEM, et al., 2006; MONQUERO, et al., 2008; WERLE et al., 2008), o que pode ocasionar resultado falso-negativo no caso das FQs.

Os resultados de ENR na granja 2 foram os mais elevados (105,6 µg kg^{-1}) e demonstraram contaminação do perfil do solo, uma vez que os valores calculados estiveram acima do tolerável (100 µg kg^{-1}) (PEREIRA et al., 2012). Essa granja apresentou os maiores valores de CTC (Tabela 6.5), indicando relação entre esse parâmetro químico e a sorção de FQs. As demais propriedades apresentam menores valores de CTC, fato que facilita a lixiviação. Há a possibilidade desses compostos estarem em camadas mais profundas do solo. As concentrações de FQs aqui detectadas foram inferiores às detectadas no capítulo 3 (Tabelas 3.10, 3.11 e 3.12), assim como os parâmetros químicos (Tabelas 3.14 e 6.5), principalmente nas Granjas 3 e 4. Além disso, os solos amostrados apresentam característica arenosa (Tabela 6.6), o que facilita a lixiviação.

Tabela 6.5 – Análises químicas de solos coletados próximos aos galpões de produção.

PRODUTOR	Profundidade (cm)	pH	MO	P	K	Ca	Mg	Soma bases	CTC
		$CaCl_2$	g dm^{-3}	resina mg dm^{-3}	----------mol$_c$ dm^{-3} ----------				
Granja 1	0-20	5,8	37	102	2,8	48	24	75	91
	20-40	5,8	11	58	5,8	53	33	92	110
	40-60	5,8	9	34	5,6	45	35	86	105
Granja 2	0-20	4,1	11	18	3,8	84	40	128	237
	20-40	4,2	9	16	3,9	80	43	127	221
	40-60	4,2	5	12	3,9	82	44	130	240
Granja 3	0-20	4,7	9	34	2,7	30	13	46	74
	20-40	4,7	5	19	3,0	23	10	36	61
	40-60	4,5	5	18	3,0	19	15	37	62
Granja 4	0-20	5,6	19	21	1,2	40	6	47	62
	20-40	5,5	12	13	1,7	35	8	45	68
	40-60	5,5	7	7	1,8	32	6	40	59
Granja 5	0-20	5,5	37	186	2,7	36	16	55	80
	20-40	5,4	25	130	2,8	32	12	47	76
	40-60	5,2	15	124	2,7	19	18	40	73
Granja 6	0-20	3,8	16	20	1,3	31	10	42	94
	20-40	3,7	12	16	1,4	24	8	33	82
	40-60	3,7	9	14	1,5	15	7	23	74

Tabela 6.6 - Análises físicas de solos coletados próximos aos galpões de produção.

PRODUTOR	Profundidade (cm)	Argila	Silte	Areia total
		<0,002mm	0,053-0,002mm	2,00-0,05mm
		---------- g kg^{-1} ----------		
Granja 1	0-20	163	97	740
	20-40	352	178	470
	40-60	389	186	425
Granja 2	0-20	341	269	390
	20-40	356	258	386
	40-60	378	243	379
Ganja 3	0-20	256	254	490
	20-40	259	241	500
	40-60	263	239	498
Ganja 4	0-20	149	91	760
	20-40	136	103	761
	40-60	138	105	757
Granja 5	0-20	182	168	650
	20-40	175	176	649
	40-60	150	183	667
Granja 6	0-20	134	16	850
	20-40	127	59	814
	40-60	142	42	816

Nas coletas até 4 m de profundidade também foi possível observar lixiviação de ENR (Tabela 6.4). Essa mobilidade no solo provavelmente está relacionada às baixas quantidades de carga negativa do solo, diminuindo a sorção. Essas amostras apresentaram baixos valores de CTC, MO (Tabela 6.7) e característica arenosa (Tabela 6.8). A presença de fármacos até a profundidade analisada é preocupante, pois, mesmo que em baixas concentrações, elas provavelmente podem atingir o lençol freático.

Tabela 6.7 - Análises químicas de solos coletados no local do poço piezométrico.

Profundidade	pH	MO	P	K	Ca	Mg	Soma Bases	CTC
	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg dm^{-3}	----------mmol$_c$ dm^{-3}----------				
0-0,2 m	4,2	9	5	0,5	15	6	22	50
1 m	3,8	5	2	0,6	22	17	40	206
2 m	3,8	2	2	0,8	31	23	55	205
3 m	3,8	2	3	1,2	44	26	71	159
4 m	4,2	2	3	1,5	69	32	103	191

Tabela 6.8 - Análises físicas de solos coletados no local do poço piezométrico.

Profundidade	Argila	Silte	Areia total
	< 0,002 mm	0,053-0,002 mm	2,00-0,05mm
0-0,2 m	162	98	740
1 m	318	332	350
2 m	298	442	260
3 m	346	434	220
4 m	323	417	260

Estudos mostram que as FQs apresentam alto coeficiente de sorção, sendo consideradas imóveis no solo (TOLLS, 2001). Entretanto a maior parte dos trabalhos foi realizada em solos de regiões temperadas que possuem alta CTC. No Brasil há predominância de solos intemperizados, com baixa CTC e dependentes do pH (FONTES; ALLEONI, 2006) e, mesmo quando são argilosos, apresentam argilas de baixa atividade, sugerindo baixo potencial de sorção de fármacos de uso veterinário. Apesar dos solos com baixo pH gerarem moléculas de FQs catiônicas, uma vez que são compostos anfóteros (GU, KARTHIJEYAN, 2005; PICÓ; ANDRÉU, 2007), provavelmente não houve cargas negativas suficientes para causar adsorção neste estudo.

Um estudo aponta decréscimo nas concentrações de NOR, ENR e CIP em profundidade, indicando mobilidade limitada das FQs no solo (GOLET et al., 2002). Em

experimentos realizados em campo houve diminuição na concentração de CIP e NOR com o aumento de profundidade (aplicações de 0,05 a 0,3 mg kg^{-1} no solo). No entanto, as amostras foram coletas em Zurich/Suíça e apresentaram características de solo diferentes dos solos brasileiros, com pH próximo a 7,0 e maior teor de argila (38%) (GOLET et al., 2002). Mas como no presente estudo, os autores também concluíram que as FQs são fármacos persistentes e podem acumular em solos. Já em solos com pH abaixo de 5,9, Paul et al. (2014) observaram taxas de adsorção superiores a 0,8 μmol m^{-2}, onde mais de 80% da FQ (ofloxacina) aplicada sofreu adsorção ao solo, assim como neste estudo, onde os valores de pH foram inferiores a 5,9 para todas as amostras. As taxas de adsorção nas primeiras camadas de solo foram baixas devido à baixa CTC, mesmo assim observou-se adsorção de NOR, ENR e CIP, principalmente nos solos coletadas ao lado dos galpões de produção.

No local onde o solo foi coletado até 4 m de profundidade observou-se acúmulo de ENR em profundidade (Tabela 6.4). Pode-se afirmar que esses valores estão relacionados à maior CTC e teor de argila dessas camadas amostradas (Tabelas 6.7 e 6.8). Outros estudos também afirmaram que o fator principal para o sorção de FQs em solos é a CTC (WANG et al., 2011; QIN et al., 2014). Wang et al. (2011) observaram que mais de 95% da CIP adicionada aos minerais de argila sofreram sorção em menos de 8 h. Qin et al., (2014) observaram que a sorção também foi dependente de pH, pois a adsorção máxima aos minerais de argila ocorreu em pH 6,0, valor próximo ao pKa_1 do composto testado, levofloxacina (LEV) que pertence ao grupo das FQs. Esses autores justificaram que em meio ácido as FQs estão em sua forma catiônica e acabam sendo atraídas pelas cargas negativas dos solos, em pH acima de 7,0 ocorre a diminuição dessa interação eletrostática e acima de 9,0 ocorre repulsão, pois esses fármacos estão predominantemente na forma aniônica. Eles ainda observaram que a presença de Ca^{+2} em solução prejudica a adsorção, provavelmente devido à formação do complexo Ca^{+2}-LEV em solução. Outros autores também relataram que a adsorção de NOR em solos com alto teor de ferro e alumínio foi suprimida na presença de cátions divalentes e seguiram a seguinte ordem: Cu^{+2}> Zn^{+2}> Ca^{+2}> Mg^{+2} (KONG et. al., 2014). No entanto, esses resultados ainda são contraditórios, pois há estudos que demonstraram aumento na adsorção de ofloxacina (também pertencente ao grupo das FQs) na presença de Ca^{+2} (GOYNE et al., 2005). Esses autores explicam que essa interação de FQs com cátions metálicos (Ca^{+2} e Mg^{+2}) ocorre devido à formação de pontes de cátions (NOWARA et al., 1997; GOYNE et al., 2005; SPELTINI et al., 2011). O fato é que cátions metálicos são comuns em solos e podem afetar a adsorção de FQs e esta interação ainda não está bem compreendida, portanto há necessidade de estudos específicos para entender

completamente a dinâmica das FQs em solos, além disso, a interação entre FQs, ânions e adsorção tem sido pouco relatada em literatura (TANIS, HANNA, 2008; XU et al., 2011; QIN et al., 2014).

A MO é outro fator que interfere na adsorção de FQs em solos com pH abaixo de 6,0, pois observou-se adsorção de NOR em solos agrícolas com altos teores de MO (KONG, et al., 2014). No entanto, os mesmos autores relataram que a influência da MO na sorção desses compostos é menor do que da CTC e do pH.

Geralmente os solos brasileiros são intemperizados e assim apresentam fatores que propiciam a lixiviação de bases e provavelmente FQs: baixa CTC, baixos teores de MO e meio ácido. São necessárias medidas para controlar a entrada desses fármacos no ambiente, pois uma vez que atinjam os solos, ocorrerá lixiviação.

6.4 Conclusões

A lixiviação de NOR, ENR e CIP só foi observada quando se analisou amostras de solo. Esses antimicrobianos não foram detectados em água percolada, podendo induzir falsas conclusões a respeito da lixiviação desses fármacos.

Referências

BOXALL, A.B.A., BLACKWELL, P., CAVALLO, R., KAY, P., TOLLS, J. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. **Toxicology Letters,** Amsterdam, v. 131, n. 1-2, p. 19-28, May 10 2002.

CARRASQUILLO, A.J.; BRULAND, G.L.; MACKAY, A.A.; VASUDEVAN, D. Sorption of ciprofloxacin and oxytetracycline zwitterions to soils and soil materials: influence of compound structure. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 42, p. 7634-7642, Jul 2008.

FINLEY, R.L.; COLLIGNON, P.; LARSSON, D.G.J.; MCEWEN, S.A.; LI, X.Z.; GAZE, W.H.; The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v.57, p.704-710, Sep 2013.

FONTES, M.P.F.; ALLEONI, L.R.F. Eletrochemical atributes and availability of nutrients, toxic elements, and heavy metals in tropical soils. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 63, n. 6, p. 589-608, Nov-Dec. 2006.

GOLET, E.M.; STREHLER,A.; ALDER, A.C.; GIGER, W. Determination of fluoroquinolone antibacterial agents in sewage sludge and sludge-treated soil using accelerated solvent extraction followed by solid-phase extraction. **Analytical Chemistry,** Washington, DC, v.74, p.5455-5462, Nov 2002.

GOLET, E.M., XIFRA, I., SIEGRIST, H., ALDER, A.C., GIGER, W. Environmental exposure assessment of fluoroquinolone antibacterial agents from sewage to soil. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 37, n. 15, p. 3243-3249, Aug 1 2003.

GOYNE, K.W.; CHOROVER, J.; KUBICKI, J.D.; ZIMMERMAN, A.R.; BRANTLEY, S.L. Sorption of the antibiotic ofloxacin to mesoporous and nonporous alumina and silica. **Journal of Colloid and Interface Science,** New York, v. 283, n. 1, p. 160-170, Mar 2005.

GU, C.; KARTHIKEYAN, K. G. Sorption of the antimicrobial ciprofloxacin to aluminum and iron hydrous oxides. **Environmental Science & Technology,** Easton, v. 39, n. 23, p. 9166-9173, Dec 2005.

HIRSCH, R., TERNES, T., HABERER, K., KRATZ, K.L. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. **Science of the Total Environment,** Amsterdam, v. 225, n. 1-2, p. 109-118, Jan 12 1999.

HU, X. G.; ZHOU, Q. X.; LUO, Y. Occurrence and source analysis of typical veterinary antibiotics in manure, soil, vegetables and groundwater from organic vegetable bases, northern China. **Environmental Pollution**, London, v.158, p.2992–2998, Sep 2010.

KAY, P.; BLACKWELL, P. A.; BOXALL, A. B. A. Column studies to investigate the fate of veterinary antibiotics in clay soils following slurry application to agricultural land. **Chemosphere,** Oxford, v. 60, n. 4, p. 497-507, Jul 2005.

KONG, X.S.; FENG, S.X.; ZHANG, X.; LI, Y. Effects of bile salts and divalent cations on the adsorption of norfloxacin by agricultural soils. **Journal of Environmental Sciences,** Beijing**,** v. 26, n. 4, p. 846-854, Apr 2014.

MONQUERO, P.A.; AMARAL, L.R.; BINHA, D.P.; SILVA, A.C.; SILVA, P.V. Leaching potential of herbicides in soil under different rainfall simulations. **Planta Daninha,** Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 403-409, Apr-Jun 2008.

MUGGLER, C.C.; SOBRINHO, F.A.P.; MACHADO, V.A. Educação em solos: princípios, teoria e métodos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 733-740, Jul-Aug 2006.

NOWARA, A.; BURHENNE, J.; SPITELLER, M. Binding of fluoroquinolone carboxylic acid derivatives to clay minerals. **Journal of Agricultural Food and Chemistry**, Washington, DC, v.45. p.1459-1463, Apr 1997.

OSTERMANN, A., GAO, J., WELP, G., SIEMENS, J., ROELCKE, M., HEIMANN, L., NIEDER, R., XUE, Q.Y., LIN, X.Y., SANDHAGE-HOFMANN, A., AMELUNG, W. Identification of soil contamination hotspots with veterinary antibiotics using heavy metal concentrations and leaching data-a field study in China. **Environmental Monitoring and Assessment,** Dordrecht, v. 186, n. 11, p. 7693-7707, Nov 2014.

PAUL, T.; LIU, J.Y.; MACHESKY, M.L.; STRATHMANN, T.J. Adsorption of zwitterionic fluoroquinolone antibacterials to goethite: A charge distribution-multisite complexation model. **Journal of Colloid and Interface Science,** New York, v. 428, p. 63-72, Aug 2014.

PEREIRA, L.A.; JARDIM, I.C.S.F.; FOSTIER, A.H.; RATH, S. Ocorrência, comportamento e impactos ambientais provocados pela presença de antimicrobianos veterinários em solos. **Química Nova**, São Paulo, v.35, n.1, p.159-169, Sep 2012.

PICO, Y.; ANDREU, V. Fluoroquinolones in soil - risks and challenges. **Analytical and BioAnalytical Chemistry,** Heidelberg, v. 387, n. 4, p. 1287-1299, Feb 2007.

QIN, X.P.; LIU, F.; WANG, G.C.; WENG, L.P.; LI, L. Adsorption of levofloxacin onto goethite: Effects of pH, calcium and phosphate. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces,** Amsterdam, v. 116, p. 591-596, Apr 2014.

ROSOLEM, C.A.; GARCIA, R.A.; SIMONETI FOLONI, J.S.; CALONEGO, J.C. Potassium leaching in soil as affected by potassium fertilizer rates applied over pearl millet straw. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**,Viçosa, v. 30, n. 5, p. 813-819, Sep-Oct 2006.

SILVA, F.A.S.; AZEVEDO, C.A.V. **Principal components analysis in the software Assistat** - Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, 2009, Reno, NV. St. Joseph: ASABE, 2009.

SPELTINI, A.; STURINI, M.; MARASCHI, F.; PROFUMO, A.; ALBINI, A. Analytical methods for the determination of fluoroquinolones in solid environmental matrices. **Trac-Trends in Analytical Chemistry,** Amsterdam, v. 30, n. 8, p. 1337-1350, Sep 2011.

STURINI, M.; SPELTINI, A.; MARASCHI, F.; RIVAGLI, E.; PROFUMO, A. Solvent-free microwave-assisted extraction of fluoroquinolones from soil and liquid chromatography-fluorescence determination. **Journal of Chromatography A**, New York, v. 1217, n. 47, p. 7316-7322, Nov 2010.

TANIS, E.; HANNA, K.; EMMANUEL, E. Experimental and modeling studies of sorption of tetracycline onto iron oxides-coated quartz. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects,** Amsterdam, v. 327, n. 1-3, p. 57-63, Sep 2008.

TOLLS, J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: A review. **Environmental Science & Technology**, Easton, v. 35, n. 17, p. 3397-3406, Sep 2001.

TONG, L., LI, P., WANG, Y., ZHU, K. Analysis of veterinary antibiotic residues in swine wastewater and environmental water samples using optimized SPE-LC/MS/MS. **Chemosphere,** Oxford, v. 74, n. 8, p. 1090-1097, Feb 2009.

TURIEL, E.; MARTIN-ESTEBAN, A.; TADEO, J. L. Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC-UV. **Analytica Chimica Acta,** Amsterdam, v. 562, n. 1, p. 30-35, Mar 2006.

WANG, C.-J.; LI, Z.; JIANG, W.-T. Adsorption of ciprofloxacin on 2:1 dioctahedral clay minerals. **Applied Clay Science**, Amsterdam, v. 53, n. 4, p. 723-728, Oct 2011.

WERLE, R.; GARCIA, R. A.; ROSOLEM, C. A. Potassium leaching as affected by soil texture and potassium availability. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 6, p. 2297-2305, Nov-Dec 2008.

XU, L.; DAI, J.; PAN, J.; LI, X.; HUO, P.; YAN, Y.; ZOU, X.; ZHANG, R. Performance of rattle-type magnetic mesoporous silica spheres in the adsorption of single and binary antibiotics. **Chemical Engineering Journal,** Lausanne, v. 174, n. 1, p. 221-230, Oct 2011.